

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Gilson Pires Dorneles

**Influência da capacidade
cardiorrespiratória e do exercício físico
agudo sobre a frequência periférica de
monócitos e subpopulações de linfócitos T
de homens eutróficos e obesos: perfil
inflamatório e fatores epigenéticos**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2019

Gilson Pires Dorneles

**Influência da capacidade
cardiorrespiratória e do exercício físico
agudo sobre a frequência periférica de
monócitos e subpopulações de linfócitos T
de homens eutróficos e obesos: perfil
inflamatório e fatores epigenéticos**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientador: Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão

Coorientadora: Dra. Alessandra Peres

Porto Alegre

2019

Catálogo na Publicação

Dorneles, Gilson Pires

Gilson Pires Dorneles Influência da capacidade cardiorrespiratória e do exercício físico agudo sobre a frequência periférica de monócitos e subpopulações de linfócitos T de homens eutróficos e obesos : perfil inflamatório e fatores epigenéticos / Gilson Pires Dorneles. -- 2019.

143 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Orientador(a): Pedro Roosevelt Torres Romão ;
coorientador(a): Alessandra Peres.

1. Obesidade. 2. Sistema imune. 3. Inflamação. 4. Exercício físico. 5. Aptidão cardiorrespiratória. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A vida acadêmica muitas vezes é solitária e repleta de incertezas, mas ao final destes quatro anos percebo que nunca estive só. Henry Thoreau escreveu uma vez que “a felicidade só é real quando compartilhada”. Sendo assim, gostaria de expressar minha gratidão a quem me fez seguir em frente.

Eu tive a felicidade de ser orientador por dois grandes professores da imunologia brasileira que, com as suas personalidades contribuíram de forma enorme para o meu aprendizado e pela formação de pesquisador mostrando que a formação científica compreende valores de ética, análise crítica e imparcial de toda evidência obtida e pela necessidade de constante aprendizado. Ambos não pouparam esforços para que esse projeto saísse do papel, procurando alternativas financeiras e metodológicas para cada dificuldade que foi surgisse. Ao Pedro, pela confiança, pelas oportunidades, pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança e amizade, pelo exemplo de integridade, e pelas experiências profissionais que me possibilitou. A Alessandra, pela amizade nestes quase oito anos de convívio, pela constante troca de ensinamentos e experiências acadêmicas e de vida, por abrir as portas da UFCSPA e pelo ensinamento de que ciência se faz em colaboração.

Ao professor Pedro Dal Lago, por abrir as portas de seu laboratório e confiar a utilização do setor de ergoespirometria e pela sua enorme contribuição no desenvolvimento do projeto e na escrita dos artigos. Estendo meus agradecimentos aos alunos e pesquisadores do Grupo de Pesquisa em Interação Cardiopulmonar.

Ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, sobretudo, ao queridos colegas de doutorado, mestrado e alunos de iniciação científica que aqui passaram e que aqui estão. Devo fazer um agradecimento nominal aos melhores alunos de IC, fundamentais em todas as etapas deste projeto e que sempre estiveram presentes, que alguém poderia ter: Lucas Schipper, Igor Martins da Silva, Diandra Valentini, Maeli Santos. Espero ter contribuído com a formação profissional de vocês na mesma proporção que vocês contribuíram durante este trabalho, nas longas conversas e horas do café, durante os intermináveis experimentos e na alegria de ter vocês por perto.

Aos colegas de mestrado e doutorado que tornaram-se grandes amigos e companheiros de laboratório nestes quatro anos: Maria Carolina Boeira, Rose Augustini, Elana Stein, Luisa Schiavini, Amanda Sotoriva, Mauren Mansur, Carol Lavratti, Thais Guimarães, Bianca Cavalheiro, Grazi Fardin Viviane Fagundes. Todo o sucesso do mundo para vocês!

Aos meus queridos colegas de laboratório, e grandes amigos que fiz no último ano, Keli e Tiago. Torço muito pelo sucesso profissional e pessoal de vocês!

Aos professores da Pós-Graduação da UFCSPA com os quais tive oportunidade de contribuir em pesquisas, que foram exemplos de pesquisadores e professores e também àqueles que marcaram minha trajetória neste período: Elizandra Braganhol, Rodrigo Plentz, Aline Pagnussat, Gisele Branchini, Dinara Moura, Alethea Gatto, Mônica Oliveira, Renata Guedes e Silvana de Almeida.

Aos professores e pesquisadores que muito me ensinaram e com os quais tive a oportunidade de contribuir no desenvolvimento de pesquisas: Luiz Carlos Rodrigues, Vanessa Andrade, Ana Paula Fayh, Simone Fonseca, Mauricio Krause, Fabio Lira, Mariane Monteiro, Viviane Elsner, José Chies, Alexandre Mello.

Aos colegas da pós-graduação Jociane, Luis Fernando, Candissa, Gustavo, Ana Paula, Gabriela, Bruna, Rose, Alexandre, Vinicius, Carmela, Kalinca, Lucas, Naira, Maira, pelas conversas acadêmicas (ou não tão acadêmicas) e pela oportunidade de colaborar e aprender com vocês.

Aos meus amigos pelos momentos de alegria, boas conversas, e também por compreenderem as tantas faltas e ausências.

Aos meus alunos, que me oportunizaram ensinar e devolver aquilo que aprendo diariamente.

Aos funcionários da Pós-Graduação da UFCSPA, em especial à Cris, Maristela e Giovana, secretárias que passaram pelo PPG-Ciências da Saúde. Devo também fazer menção aos funcionários da UFCSPA, de técnicos aos seguranças e, em especial, a Claudete e Ester, estimadas “tias do café”.

A CAPES pelo apoio financeiro e concessão de uma bolsa de estudos.

Ao meu irmão Gerson pela amizade e momentos de alegria nessa vida.

Um agradecimento especial a minha namorada Tamires, pelo amor, companheirismo, por aceitar e compreender a minha obstinação com o trabalho. Por comemorar cada pequena vitória do nosso dia, dos artigos aceitos e convites para palestras até prêmios e oportunidades profissionais. O teu apoio foi essencial para chegar aqui, e sei que podemos almejar conquistas ainda maiores.

Aos meus pais, pela formação do meu caráter, amizade, amor e apoio incondicional. Pelo apoio na busca pelo conhecimento, por estimularem em mim e no meu irmão ideias de liberdade e ética, por não permitirem que a curiosidade se perdesse ao longo dos anos.

“Utopia [...] ella está en el horizonte. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nunca la alcanzaré. Para que sirve la utopía? Para eso sirve: para caminhar.”

(Fernando Birri citado por Eduardo Galeano em *Las palabras andantes*)

Recomeça...
Se puderes,
Sem angústia e sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro,
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.
(Miguel Torga)

Resumo

Esta tese teve como objetivo avaliar o impacto agudo e crônico de diferentes tipos de exercício físico na inflamação subclínica, subtipos de monócitos, subpopulações de linfócitos T e aspectos epigenéticos em células mononucleares do sangue periférico de homens eutróficos e obesos. No estudo 1, uma sessão de exercício exaustivo induziu um aumento no fenótipo pró-inflamatório de células mononucleares (PBMCs) estimuladas com lipopolissacarídeos (LPS) devido a um estado de hiperacetilação da histona H4 e baixa atividade da enzima HDAC2 em conjunto a uma elevação na frequência de monócitos CD14+CD16+ e maior produção de interleucina (IL)-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em indivíduos obesos. No estudo 2, o exercício intervalado de alta intensidade induziu uma mobilização similar de células T CD4+CD25+CD39+ (células T reguladoras de memória, mTreg) e CD4+CD25-CD39+ (células T efectoras de memória, mTeff) imediatamente após o exercício em homens com baixa e alta capacidade cardiorrespiratória. A redistribuição de células mTeff 1 h após a sessão é dependente da capacidade cardiorrespiratória, uma vez que homens com alta capacidade cardiorrespiratória apresentaram uma queda na frequência de mTeff abaixo dos valores basais. O estudo 3 identificou que uma alta capacidade cardiorrespiratória é capaz de modular as alterações imunes associadas a obesidade como a frequência periférica de células T reguladoras, as frequências periféricas de células mTreg, mTeff e monócitos CD14+CD16+ e CD14-CD16+. Um desequilíbrio entre as concentrações de citocinas pró- (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-33) foi observado em indivíduos eutróficos e obesos em relação à capacidade cardiorrespiratória. Em conclusão, diferentes protocolos de exercício físico modulam a resposta inflamatória através de mecanismos epigenéticos e alterações no fenótipo de células imunes. Além disso, altos níveis de capacidade cardiorrespiratória apresentam importantes efeitos no controle das alterações celulares e moleculares induzidas pela obesidade.

Palavras-chaves: exercício físico, capacidade cardiorrespiratória, linfócitos T, monócitos, imunofenotipagem, inflamação, citocinas.

Abstract

This thesis aimed to evaluate the acute and chronic impact of different types of physical exercise on subclinical inflammation, monocyte subtypes, T cells subpopulations and epigenetic aspects in peripheral blood mononuclear cells of lean and obese men. In study 1, one session of strenuous exercise induced an augment in proinflammatory phenotype of mononuclear cells (PBMCs) stimulated with lipopolysaccharide (LPS) through histone H4 hiperacetylation status and low activity of HDAC2 in association with an elevation in the frequency of monocyte CD14+CD16+ and higher production of interleukin(IL)-8 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in obese individuals. In study 2, the high intensity interval exercise induced a similar mobilization of T cells CD4+CD25+CD39+ (memory regulatory T cells, mTreg) and CD4+CD25-CD39+ (memory effector T cells, mTeff) immediately after the bout in men with low and high cardiorespiratory fitness (CRF). The redistribution of mTeff cells 1 h after the exercise was dependent of CRF status, since men with higher CRF presented a decrease in the frequency of mTeff bellow to the baseline values. The study 3 identified that a higher CRF was able to modulate the obesity-associated immune alterations, such as the peripheral frequency of regulatory T cells, mTreg, mTeff and CD14+CD16+ and CD14-CD16+ monocytes. An imbalance between the concentrations of pro- (IL-6 and TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10 and IL-33) cytokines was observed in lean and obese individuals in accordance with their CRF status. In conclusion, different protocols of physical exercise modulate the inflammatory response through the epigenetic mechanisms and the immune cell phenotypes. In addition, higher levels of CRF have pivotal effects in the control of obesity-induced cellular and molecular immunological alterations.

Key-words: physical exercise, cardiorespiratory fitness, T lymphocytes, monocytes, immunophenotyping, inflammation, cytokines.

Lista de abreviações

β2-AR – Receptor beta-adrenérgicos tipo-2

Acetil-CoA – Acetil-Coenzima A

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

AMPK - AMP-activated protein kinase

APC – Células apresentadoras de antígeno

ATP – Adenosina trifosfato

CCR – Receptor de quimiocina C-C

CD – Cluster de diferenciação

CLS – Estruturas em forma de coroa

CO₂ – Dióxido de carbono

COX – Ciclooxygenase

CMV - Citomegalovírus

CSF-1 – Fator estimulante de colônia – 1

CTLA-4 - Proteína Associada aos Linfócitos T Citotóxicos-4

CXCL5 – Quimiocina do tipo C-X-C - 5

CXCR – Receptores de quimiocina tipo CXC

DAMPs – Padrões moleculares associados ao dano

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNMT3B - DNA Methyltransferase 3 Beta

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

ENTP-Dase - Ectonucleotidase 50-triphosphohydrolases

FCγRIII – Receptor tipo 3 para porção gama da região Fc de imunoglobulinaG

FoxP3 - *forkhead box P3*

GATA3 – proteína ligante GATA-3

H1N1 – Vírus Influenza subtipoA

H3K9 – Histona-3 Lisina-9

HAT – Histona Acetiltransferase

HDAC – Histona Desacetilase

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIF-1 – Fator induzido por hypoxia tipo 1

HLA-DR – Antígeno de leucócito humano-DR

HSP – Proteínas de choque térmico

IgA – Imunoglobulina A

IL – Interleucina

IMC – Índice de massa corporal

INF- γ – Interferon-gamma

JNK – c-Jun N-terminal kinases

KLRG-1 - Subfamília do receptor do tipo lectina das células assassinas, membro G 1

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LPS – lipopolissacarídeo

M1 e M2 – Subtipos de macrófagos

MAPK - Proteínas Quinases Ativadas por Mitogeno

MCP-1 – Proteína de quimioatração de monócitos – 1

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

mTeff – Células T efetoras de memória CD4+CD25-CD39+

mTreg – Células T reguladoras de memória CD4+CD25+CD39+

mTOR - alvo de rapamicina em mamíferos

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear – kappaB

NLRP3 - receptor do tipo NOD-3 contendo o domínio de pirina

NK – Células Natural Killers

NO – Óxido nítrico

O₂ - Oxigênio

Pam3CSK4 – tripalmitoylcysteinylseryl-(lysyl)₄

PCR – Proteína C-reativa

PD-1 – Proteína de morte celular programada – 1

RANTES – Ligante de quimiocina do tipo C-C-5

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

RORC - receptor de hormônio nuclear órfão relacionado ao ácido retinóico C

ST2 – Receptor da interleucina-1 tipo-1

TBET – Fator de transcrição T-box

TBX21 – Fator de transcrição T-Box-21

TGF- β – Fator de crescimento transformante - beta

Th – Células T auxiliar

TLR – Receptor do tipo Toll

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

Treg – Células T reguladoras

VCAM – Molécula de adesão à célula vascular

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

VO_{2Pico} – Consumo de pico de oxigênio

VO_{2Max} – Consumo máximo de oxigênio

Lista de Figuras e Tabelas

Capítulo II – Artigo I

Tabela I – Página 4 (artigo)

Tabela II – Página 4 (artigo)

Tabela III – Página 5 (artigo)

Tabela IV – Página 5 (artigo)

Figura I –Página 5 (artigo)

Figura II – Página 6 (artigo)

Figura III – Página 7 (artigo)

Tabela V – Página 7 (artigo)

Tabela VI – Página 7 (artigo)

Capítulo III – Artigo II

Tabela I –Página 4 (artigo)

Tabela II – Página 5 (artigo)

Figura I - Página 5 (artigo)

Figura II - Página 5 (artigo)

Figura III - Página 6 (artigo)

Figura IV - Página 6 (artigo)

Capítulo IV – Artigo III

Figura I – Página 92 (tese)

Tabela I - Página 98 (tese)

Tabela II - Página 100 (tese)

Tabela III - Página 101 (tese)

Figura II - Página 103 (tese)

Figura III - Página 105 (tese)

Figura IV - Página 107 (tese)

Figura V - Página 108 (tese)

Sumário

1. APRESENTAÇÃO	15
2. CAPÍTULO I.....	17
2.1 Introdução	17
2.2 Tecido adiposo e inflamação crônica	20
2.3 O impacto da obesidade sobre monócitos periféricos humanos.....	22
2.4 O impacto da obesidade sobre Linfócitos T periféricos.....	24
2.4.1 O papel das ectonucleotidases CD39 e CD73 na inflamação subclínica da obesidade.....	26
2.5 Alterações epigenéticas em histonas de células imunes na obesidade	29
2.6 Efeitos imunoreguladores agudos do exercício físico	32
2.6.1 Resposta de monócitos ao exercício agudo	34
2.6.2 Resposta de linfócitos T ao exercício agudo	35
2.6.3 Resposta de citocinas ao exercício agudo	38
2.7 Adaptações crônicas do sistema imune ao exercício físico.....	41
REFERÊNCIAS	45
3. OBJETIVOS	64
3.1 Objetivo geral.....	64
3.2 Objetivos específicos.....	64
4. CAPÍTULO II	67
4.1 Artigo Original – Acute strenuous exercise induces an imbalance on histone H4 acetylation/ histone deacetylase 2 and increases the proinflammatory profile of PBMC of obese individuals ...	67
5. CAPÍTULO III	82
5.1 Artigo Original - Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells following high intensity interval exercise	82
6. CAPÍTULO IV	95
6.1 ARTIGO ORIGINAL – The impact of cardiorespiratory fitness on the inflammatory profile of obese men: effects in CD39 and CD73 on CD4+ T cells, regulatory T cells and monocyte subsets	95
7. CAPÍTULO V	128
7.1 Visão geral	128
7.2 Estudo I	128
7.3 Estudo II	129
7.4 Estudo III.....	131
7.5 Perspectivas Futuras.....	133

8. CONCLUSÕES.....	135
REFERÊNCIAS	136
ANEXOS.....	140
Anexo I – Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - UFCSPA.....	140
Anexo II – Normas de formatação para as revistas científicas	141

1. APRESENTAÇÃO

A ideia central para compor esta tese de doutorado surgiu a partir dos questionamentos sobre as inter-relações entre a obesidade humana, o condicionamento cardiorrespiratório, exercício físico e o sistema imunológico.

Deste modo, a presente tese está estruturada da seguinte forma:

1) Capítulo 1:

Introdução, contendo aspectos relevantes sobre obesidade, condicionamento físico e exercício e a modulação da resposta imune, bem como a justificativa para a pesquisa;

2) Capítulo 2:

Artigo original intitulado “Acute Strenuous Exercise Induces an Imbalance on Histone H4 Acetylation/Histone Deacetylase 2 and Increases the Proinflammatory Profile of PBMC of Obese Individuals” publicado no periódico *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, de fator de impacto 4.936 e classificação no extrato A2 para a área de Medicina I do Qualis CAPES, no ano de 2017.

3) Capítulo 3:

Artigo original intitulado “Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ CD25[–] and CD4⁺ CD25⁺ T cells following high intensity interval exercise” publicado no *Journal of Cellular Biochemistry*, de fator de impacto 2.959 e classificação no extrato A2 para a área de Medicina I do Qualis CAPES, no ano de 2019.

4) Capítulo 4:

Artigo original intitulado “The impact of cardiorespiratory fitness on the inflammatory profile of obese men: effects on CD39 and CD73 on CD4⁺ T cells, regulatory T cells and monocyte subsets” submetido para a revista *Metabolism – Clinical and Experimental*, de fator de impacto 5.963 e classificação no extrato A1, em estado atual de avaliação por revisores externos.

5) Capítulo 5:

Este capítulo é composto por uma discussão geral dos dados da tese, com comentários dos resultados apresentados separadamente nos manuscritos originais e perspectivas para o desenvolvimento de estudos futuros, incluindo dados originais ainda não publicados.

As considerações finais incluem aspectos conclusivos do trabalho de modo a integrar os três artigos que compõem a tese de Doutorado.

Uma vez que os resultados que compõe a tese estão publicados ou submetidos a periódicos internacionais, os capítulos 2 à 4 serão apresentados na forma de artigos em língua inglesa e com formatação específica de acordo com as diretrizes específicas de cada revista.

2. CAPÍTULO I

2.1 Introdução

A obesidade é uma condição epidêmica global, caracterizada por uma massa corporal desproporcional para a estatura do indivíduo, principalmente pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo visceral, que é comumente acompanhada por uma condição de inflamação subclínica sistêmica (1). A obesidade é associada ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e outras doenças sistêmicas (1,2). Em uma visão simplista, a expansão do tecido adiposo é desencadeada por uma série de fatores ou comportamentos como: balanço calórico positivo devido ao aumento no consumo de alimentos, sobretudo hipercalóricos e com alta palatabilidade; redução no gasto energético e no tempo dispendido em atividades físicas diárias, laborais e de lazer em paralelo a um maior comportamento sedentário; utilização de medicamentos que facilitam o ganho de massa corporal como reação adversa; estresse psicológico e sono inadequado(2). Estes e outros fatores de ordem socioeconômicos, culturais e mesmo biológicos (como a predisposição genética) estabelecem as bases para a epidemia da obesidade e doenças crônicas (3).

A inflamação crônica de baixo grau, uma elevação nos níveis sistêmicos de mediadores pró-inflamatórios como a interleucina(IL)-6 e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), é reconhecida como um evento chave para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e estabelecimento da obesidade (1,4). De modo sistêmico, a imunomodulação induzida pela obesidade afeta tanto células da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa. Deste modo, destaca-se uma maior frequência de monócitos intermediários CD14+CD16+ e não-clássicos CD14+CD16-, redução na frequência de células T auxiliares CD4+ de fenótipo Th2 em conjunto ao aumento do perfil Th1/Th17, e menor frequência de linfócitos T citotóxicos CD8+ e T reguladores (Treg, definidos como CD4+CD25+FoxP3+) (5,6). A redução na frequência de células Tregs está associada a uma menor atividade imunossupressora e anti-inflamatória, possibilitando o estabelecimento de uma inflamação crônica (7,8). Coletivamente, as alterações imunes na obesidade acarretam em uma inflamação estéril, menor capacidade de imunovigilância e no combate a diversas classes de patógenos, e maior desenvolvimento de doenças inflamatórias e auto-imunes (9).

Além de alterações fenotípicas em células imunes, a obesidade induz uma série de distúrbios na atividade e funcionamento celular. Uma maior expressão do fator nuclear kappaB (NF- κ B) é descrito em células mononucleares de indivíduos obesos, de modo a aumentar maior expressão e produção de TNF- α e IL-8 por estas células quando estimuladas (10). Evidências recentes apontam para o impacto de fatores ambientais, como sedentarismo e alimentação hipercalórica, sobre a condição de inflamação crônica da obesidade através da modulação epigenética (11). As modificações pós-transcricionais, como o aumento na acetilação de histonas, e o relaxamento do estado condensado da cromatina, impacta em uma maior fosforilação do NF- κ B e ao fenótipo M1 de macrófagos (12). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto da obesidade sobre eventos epigenéticos em histonas de células imunes.

De modo similar à obesidade, a inatividade física é considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares, e outras doenças de modo independente ao índice de massa corporal (IMC), importante marcador clínico da obesidade (13). A inatividade física induz uma condição de inflamação crônica persistente, como visualizada por uma associação inversa entre a proteína C-Reativa (PCR) e o consumo máximo de oxigênio (VO_{2Max}), um clássico marcador de condicionamento cardiorrespiratório (14). Além disso, indivíduos fisicamente inativos apresentam maior frequência periférica de linfócitos T de memória e em exaustão e uma menor frequência de linfócitos T virgens e Tregs (15,16).

Deste modo, modificações no estilo de vida, como a prática de exercícios físicos, são estratégias eficientes no tratamento da obesidade. Dentre as principais adaptações induzidas pelo exercício físico, destaca-se a melhora na capacidade funcional (capacidade cardiorrespiratória e força muscular), redução no tecido adiposo visceral e uma série de adaptações fisiológicas (modificações em funções neurológicas, cardiovasculares e endócrinas) em indivíduos fisicamente ativos (17). Estudos transversais demonstraram que indivíduos eutróficos fisicamente ativos apresentam uma melhor resposta imune a patógenos, sobretudo virais e bacterianos, e menores taxas de infecções do que indivíduos sedentários (18). Do mesmo modo, o “perfil imune” de indivíduos que se exercitam regularmente é caracterizado, sobretudo, pelo ambiente anti-inflamatório ou de regulação mediada por um balanço adequado entre fatores pró e anti-inflamatórias, melhor resposta linfoproliferativa, equilíbrio no número e/ou função de linfócitos T de diferentes fenótipos como T auxiliar do tipo 1 (Th1), Th2, Th17 e T regulador (Treg), e aumento na proporção de monócitos do fenótipo clássico (CD14+CD16-) (19,20).

Uma vez que cada sessão de exercício é importante para a indução de adaptações cardiovasculares, neuromusculares e bioquímicas, é de se esperar que a resposta imune a uma sessão de exercício contribua para as adaptações de longo prazo identificadas em estudos transversais envolvendo indivíduos treinados. Do mesmo modo, uma vez que alterações no padrão de acetilação de histonas estão relacionadas ao controle da atividade de transcrição de genes inflamatórios, é possível postular que os efeitos de imunoregulação do exercício físico possam envolver eventos epigenéticos (21). Os efeitos agudos do exercício físico no sistema imune incluem modificações na mobilização e na capacidade funcional de diversos tipos celulares, incluindo células hematopoiéticas, células de origem mielóide (monócitos e células dendríticas) e células de origem linfóide (sobretudo linfócitos T) (20). Além disso, protocolos de exercício de intensidade moderada-alta reduzem a transcrição de genes pró-inflamatórios em células imunes, e os efeitos anti-inflamatórios induzidos pela sessão de exercício parecem ser independentes de modificações no tecido adiposo (19).

Por outro lado, a noção de que o “exercício é bom” para o sistema imune parece ser dependente do tipo, intensidade e duração do protocolo. O exercício exaustivo aumenta a mobilização de células T CD4⁺ e CD8⁺ senescentes (expressando KLRG1+CD57⁺), reduz a capacidade linfoproliferativa e a expressão de marcadores de ativação celular (CD25⁺ e CD69⁺) por até 24-h (22,23). De fato, o aumento nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias após o exercício exaustivo pode estar associado a magnitude do dano tecidual e a endotoxemia sistêmica induzida pela sessão de exercício (24).

Desta forma, o exercício surge como um método de prevenção e tratamento de baixo custo econômico para disfunções imunológicas induzidas pela obesidade e outras condições mediadas por disfunções imunológicas. No entanto, diversos estudos mencionados identificaram os efeitos do exercício físico em populações não-obesas saudáveis. Possíveis mecanismos intracelulares, como eventos epigenéticos, e a modificação de aspectos da imunidade celular induzidas por diferentes modelos de exercício físico permanecem desconhecidos. Do mesmo modo, há poucos relatos acerca do impacto do nível de aptidão cardiorrespiratória, uma variável extremamente influenciada pelo treinamento físico crônico, sobre o sistema imune. Assim, a presente tese apresenta como temática central o impacto de diferentes protocolos de exercício físico sobre mecanismos de modulação do fenótipo de células imunes em indivíduos eutróficos e obesos com diferentes níveis de aptidão cardiorrespiratória.

2.2 Tecido adiposo e inflamação crônica

Evidências obtidas a partir da década de 1990 demonstraram que o tecido adiposo exerce importantes funções endócrinas e imunológicas em conjunto ao seu papel metabólico. Notavelmente, o tecido adiposo possui capacidade de produzir ao menos 75 substâncias, denominadas adipocinas, com ações inflamatórias e metabólicas (4). Desta forma, modificações no microambiente do tecido adiposo, como o aumento do tamanho e/ou volume de adipócitos, na obesidade induzem desregulações na resposta imune tanto no tecido quanto de forma sistêmica em uma condição conhecida como inflamação crônica de baixo grau (25). Apesar de diversas células imunes participarem da regulação do estado imunometabólico no tecido adiposo, monócitos/macrófagos e linfócitos T apresentam papel fundamental neste controle.

Em indivíduos eutróficos, o microambiente do tecido adiposo é caracterizado, sobretudo, por um acúmulo de células imunoreguladoras de caráter anti-inflamatório, sendo identificado uma alta frequência de macrófagos de fenótipo alternativamente ativado (M2), células Tregs, linfócitos T CD4⁺ de padrão Th2, eosinófilos e linfócitos B reguladores (26). No entanto, a expansão patológica do tecido adiposo modifica o balanço de células imunes no tecido para uma predominância de células com fenótipo pró-inflamatório, sobretudo pelo alto conteúdo de macrófagos de fenótipo clássico M1 e Linfócitos T CD4 Th1 e CD8 tipo 1 (26).

Um ponto chave para os eventos inflamatórios está relacionado com a redução de fluxo sanguíneo devido à hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, comprimindo os vasos sanguíneos e reduzindo a biodisponibilidade de oxigênio e outros nutrientes (27). Sugere-se que a hipóxia tecidual induz a liberação de citocinas inflamatórias, e fatores angiogênicos, como o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), como tentativa de estimular a revascularização e sinalizar a infiltração de macrófagos para a fagocitose de adipócitos necrosados através do aumento de quimiocinas, como a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimioatraente de monócitos tipo 1 (MCP-1/CCL2). A hipóxia também induz o aumento da fibrose do tecido adiposo (28).

Cinti et al (29) identificaram aumento da formação do fator estimulador de colônias de macrófagos (CSF-1) e grande infiltração de macrófagos em torno de adipócitos necrosados pela hipóxia gerada no microambiente do tecido adiposo. Neste estado foi descrito que os macrófagos fagocitam os resíduos de gota lipídica, liberando citocinas inflamatórias e proteínas quimioatraentes, além de formar estruturas em formato de coroa (Crown Like Structure, CLS), que são acúmulos de macrófagos em torno de adipócitos necrosados (29). Paralelamente são notados aumentos da expressão de reguladores quimiotáticos, tanto pelos

adipócitos quanto pelas células do estroma vascular, que possuem relação com a hipóxia e promovem a mobilização de monócitos da circulação sanguínea e de linfócitos T de linfonodos secundários, como fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1), MCP-1 e CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) ligand 5) (4). Além disso, há um remodelamento do endotélio vascular, sendo visualizada maior expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular como as integrinas, selectinas e VCAM-1 (molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) e alterações na hemostasia.

As alterações no microambiente do tecido adiposo também induzem grande impacto sobre o fenótipo de linfócitos T residentes e também a sua migração para o tecido adiposo. Neste sentido, Nishimura e colaboradores (2008) demonstram que a migração de Linfócitos T CD8⁺ para o tecido adiposo inflamado de camundongos obesos precede a infiltração de monócitos pró-inflamatórios, estimulando a diferenciação para o fenótipo M1 (30). Han e colaboradores (31) identificaram que o tecido adiposo acumula uma alta quantidade de células T com fenótipo de memória com alta capacidade efetora. No tecido adiposo de indivíduos obesos, é identificada uma polarização de células T para o perfil Th1/Th17, que expressam alta frequência de interferon-gama (IFN- γ) e IL-17 (32). Por outro lado, o fenótipo anti-inflamatório, células CD4⁺IL-4⁺ relacionadas ao padrão Th2, e imunoregulador, células Tregs, encontram-se reduzidos no tecido adiposo de obesos (33). De fato, há uma comunicação parácrina entre macrófagos e células T CD4⁺ através da secreção de IL-1 β e IL-17. Os níveis elevados de adipocinas, sobretudo a leptina, estão relacionados as alterações nas subpopulações de células T CD4⁺. A leptina possui função de maturação de células T no tecido adiposo, aumentando a taxa de proliferação celular e a secreção de citocinas de padrão Th1/Th17, além de reduzir a apoptose de células T através de um padrão de sinalização intracelular via mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) (34). A leptina ainda possui ação inibitória sobre a função e de células Tregs, reduzindo a expressão do FoxP3 e a secreção de citocinas anti-inflamatórias (35).

2.3 O impacto da obesidade sobre monócitos periféricos humanos

Uma vez que a obesidade é caracterizada por uma inflamação subclínica generalizada, de modo a influenciar não apenas o tecido adiposo mas também diversos outros tecidos metabolicamente ativos, é razoável supor que inúmeras classes de leucócitos periféricos também se encontrem alterados. Isto envolve a ativação direta de células imunes na circulação, modificação em sua atividade e fenótipo, seu recrutamento e também seu envolvimento em processos inflamatórios dentro de órgãos específicos, como fígado, pâncreas, músculo e tecido adiposo (36). A leucocitose descrita na obesidade parece ser influenciada sobretudo por alterações em monócitos e linfócitos T, com valores normais de outros leucócitos (37).

As alterações fenotípicas de monócitos possuem um corpo maior de evidências. O interesse em pesquisas com monócitos na obesidade ocorre devido a descoberta de sua infiltração e maturação em macrófagos no tecido adiposo de camundongos e mais tardiamente em humanos, sugerindo que estas células possuem papel primordial nos eventos inflamatórios da obesidade (38). Desta forma, uma alta contagem de monócitos (13-18%) é reportada em indivíduos com sobrepeso-obesidade, correlacionando-se com o IMC (39). A expressão de diversos marcadores de superfície celular e também a expressão de alguns genes envolvidos na resposta inflamatória de monócitos estão alteradas em indivíduos obesos. Uma alta expressão de integrinas, como CD11b, é encontrada em monócitos CD14⁺ e correlacionada com resistência insulínica em indivíduos obesos (40). Além disso, a expressão de diferentes receptores do tipo Toll (TLRs) estão elevadas na superfície celular de monócitos CD14⁺. Em uma coorte de 210 adultos, De Loera-Rodríguez e colaboradores (41) demonstraram uma alta expressão de TLR-4 em monócitos CD14⁺ (66% da intensidade média de fluorescência) em obesos comparado a indivíduos eutróficos (59%) concomitante a altos níveis de IL-6 e TNF- α e concentrações de ácidos graxos não-esterificados, um potente ativador da resposta inflamatória medida por TLR. Além disso, outras sub-classes como TLR-2 e -5 também parecem estar elevados (42–44).

Dentre os possíveis efeitos da obesidade sobre a expressão de TLR, destaca-se o impacto da hiperleptinemia, altos níveis de ácido graxo livre e de lipopolissacarídeo (LPS) sistêmicos como estimulantes do padrão pró-inflamatório de TLR em monócitos de indivíduos obesos (45). A hiperativação de TLRs e outras moléculas co-estimulatórias modificam marcadores do balanço de monócitos pró- e anti-inflamatórios, com redução na expressão de RNAmensageiro (RNAm) para CD163 e IL-10, dois importantes marcadores da

atividade anti-inflamatória de monócitos (46). Corroborando com isso, monócitos de mulheres obesas apresentam uma baixa diferenciação para o fenótipo M2 *in vitro* quando comparadas a controles eutróficas (47).

Além disso, monócitos de indivíduos obesos apresentam grande taxa de produção de radicais livres e ativação e estresse do retículo endoplasmático, sendo também encontrado grande responsividade a produção de TNF- α induzido por LPS em cultura de células (36). A alta produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos quando estimulados por lipopolissacarídeo, um ligante clássico de TLR-4, foi associada a altos níveis de hemoglobina glicada e triglicerídeos em indivíduos com sobrepeso (48). Scholtes e colaboradores (44) identificaram que dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, apenas a presença de obesidade correlacionou-se com o aumento da expressão de TLR-2 e TLR-4 após estimulação com seus ligantes, tripalmitoylcysteinylseryl-(lysyl)4 (Pam3CSK4) e LPS, respectivamente.

Monócitos são considerados uma heterogênea população de células de origem mielóide que pode ser subdividida de acordo com o padrão de expressão de CD14 (um co-receptor para LPS) e CD16 (um receptor de baixa afinidade FC γ III). Desta forma, basicamente demonstra-se três subpopulações de monócitos humanos: CD14+CD16- (“monócitos clássicos”), CD14+CD16+ (“monócitos intermediários”) e CD14-CD16+ (“monócitos não-clássicos”) que apresentam grandes alterações na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias entre si (49). Em conjunto a maior produção de citocinas pró-inflamatórias e atividade do fator de transcrição NF- κ B, monócitos intermediários e não-clássicos apresentam alterações funcionais como redução na capacidade microbicida e menor processamento e apresentação de antígenos.

Uma alta frequência de monócitos CD14+CD16+ é reportada em obesos comparados a indivíduos eutróficos, correlacionando-se com disfunções carotídeas, riscos cardiovasculares, IMC e marcadores insulinêmicos (50,51). Uma maior atividade pró-inflamatória de monócitos CD16+ foi associada a distribuição de gordura central em indivíduos obesos em comparação a obesos com distribuição de tecido adiposo sistêmico (52). Já células CD14+CD16- possuem inconsistentes relatos na literatura, enquanto alguns estudos demonstram baixa associação com a obesidade, outros demonstram que crianças obesas possuem tanto células CD14+CD16- quanto CD14+CD16+ alteradas (26,50). No entanto, principalmente monócitos intermediários CD14+CD16+ e não-clássicos CD14-CD16+ apresentam alta expressão de receptores de quimiocinas CCR2, CXCR1 e CCR5, maior produção de citocinas pró-

inflamatórias e uma maior capacidade migratória em comparação a monócitos CD16⁺ de indivíduos eutróficos (5,53).

2.4 O impacto da obesidade sobre Linfócitos T periféricos

Quando analisado os tipos de linfócitos, as populações de linfócitos T, identificados pela expressão de CD3⁺, apresentam um maior número de dados na literatura e tem recebido maior atenção devido ao seu papel chave nos eventos inflamatórios no tecido adiposo em comparação a Linfócitos B CD19⁺ (37). É relatado que células T contribuem para a infiltração e modificação de fenótipo de macrófagos, além de participarem do desenvolvimento de resistência insulínica (54). Estudos demonstram um aumento de células CD3⁺ em obesos mórbidos e sua associação com desregulações no perfil lipídico (55,56). Enquanto Viardot et al (40) demonstraram um aumento na expressão de CD25 na superfície de células T, outros autores não identificaram diferenças na expressão de HLA-DR na superfície de linfócitos de obesos (57). A frequência periférica de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ também parecem estar alteradas, com aumento na frequência de Linfócitos T CD4⁺ e redução de células T CD8⁺ (58).

Evidências enfatizam o papel de células T auxiliares CD4⁺ na resposta imune de indivíduos obesos, no controle das interações entre adipócitos e células imunes, e na progressão das doenças associadas a obesidade. A frequência de células T CD4⁺ é positivamente correlacionada com o índice de massa corporal (IMC) e medidas de adiposidade central em obesos. O excesso de tecido adiposo parece induzir um padrão Th17 elevado, onde citocinas como TNF- α , IL-17, IL-21 e IL-6 encontram-se elevadas (32,59). Recentemente, Ip e colaboradores (60) demonstraram que os fenótipos Th1/Th17 impactam diretamente na resistência insulínica, sendo identificados níveis elevados de TNF- α e de citocinas relacionadas ao padrão Th17 em indivíduos obesos. A alteração no padrão de linfócitos auxiliares com predomínio do fenótipo Th1 e redução do tipo 2 (Th2) é uma característica da obesidade, sendo bem estabelecido no modelo animal onde camundongos com uma dieta hiperlipídica apresentaram modificações no fenótipo para Linfócitos CD4⁺Th1 (30,61). Estas alterações no fenótipo de células T parecem ser influenciadas pela produção alterada de adipocinas, uma vez que leptina induz uma polarização para o fenótipo Th1/Th17 em obesos (62,63).

Estas alterações implicam no aumento da inflamação generalizada, uma vez que o padrão Th1 atua sinergicamente com macrófagos polarizados M1 e resultando em aumento da

expressão gênica de outras citocinas com atividade inflamatória como a IL-2, TNF- α e de proteínas quimiotáticas, além de induzir a ativação de monócitos/macrófagos e de mecanismos citotóxicos de linfócitos T (64). Análises in vitro demonstraram um aumento significativo na razão entre citocinas de padrão Th1/Th2 em indivíduos com sobrepeso (40).

A obesidade também altera o repertório do receptor de célula T (TCR), induz uma involução tímica precoce, estando associada a um acúmulo de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória no sangue periférico. Recentemente, Wang e colaboradores (65) identificaram uma maior expressão de proteína de morte celular programada (PD-1) e do PD-1ligante (PD-1L) na superfície de células T de indivíduos obesos, e uma menor resposta efetora contra tumores e vírus. A saúde metabólica de indivíduos obesos parece impactar diretamente no perfil de células T, uma vez que indivíduos obesos metabolicamente não saudáveis, com alterações no perfil lipídico e glicêmico, apresentaram maior frequência de células ativadas CD4⁺CD278⁺ (66). De fato, alterações metabólicas em células T na obesidade devido ao excesso de ácidos graxos livres saturados e uma saturação na capacidade oxidativa contribuem para a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para um fenótipo de memória efetora (67).

A imunossenescência identificada em indivíduos obesos esteve relacionada a menor expressão de CD69, CD28 e CD40L em células T CD4⁺ e CD8⁺, e uma menor produção de INF- γ e granzima B por células mononucleares estimuladas com o vírus da influenza A (H1N1) (68,69). Desta forma, a inflamação de indivíduos obesos, caracterizada por um perfil Th1/Th17 está associada a uma menor resposta imune quando estimuladas com agentes imunógenos, caracterizando-se uma inflamação estéril (25). Células mononucleares de indivíduos eutróficos incubadas com plasma obtido de paciente em obesidade mórbida apresentaram maior produção espontânea (não estimulada) de IL-1 β e IL-8 e menor expressão de CD28 (70). De fato, indivíduos obesos apresentaram alteração na resposta imune a vacinação para o vírus influenza, como identificado por menor ativação de células CD8⁺ específicas e redução na produção de INF- γ (71).

Indivíduos obesos apresentam redução no número de células Tregs periféricas (CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺), além de uma supressão da atividade anti-inflamatória de Tregs pela baixa síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 durante a obesidade (72). Uma correlação inversa entre a frequência periférica de células Treg CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} e marcadores de adiposidade corporal, sobretudo IMC e circunferência do abdômen, e com a leptina foi identificada em indivíduos com sobrepeso-obesidade (IMC > 27.5 kg/m²) (7). Consistentemente, uma baixa frequência periférica de células Treg (identificadas como CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}FoxP3⁺) foi observada em crianças obesas com síndrome metabólica

(73). Além disso, uma baixa capacidade de diferenciação de células Tregs foi reportada. Por outro lado, um estudo reportou aumento na contagem de células Tregs de obesos mórbidos acompanhado por um aumento na produção de citocinas de padrão Th2 (55). Isto pode estar relacionado a uma tentativa de imunorregulação por parte da imunidade adaptativa em condições de obesidade extrema.

A baixa frequência de Treg está ligada ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, diabetes mellitus e doença arterial coronariana (26). O eixo IL-33/ST2 é crucial para a proliferação e diferenciação de células Tregs residentes no tecido adiposo visceral, e o aumento da frequência destas células localmente pode controlar a inflamação induzida pela obesidade e melhorar parâmetros metabólicos (74,75). Recentemente demonstrou-se que crianças obesas apresentavam baixa expressão de CTLA-4 e CD25, duas moléculas essenciais na atividade imunoreguladora, na superfície de linfócitos (73). A imunoterapia através do anticorpo da proteína citotóxica de linfócitos T-4 associada (CTLA-4Ig) foi eficaz na redução da resistência à insulina, polarização de macrófagos M1 e na produção de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando o papel de células Tregs em suprimir a inflamação sistêmica e as alterações metabólicas na obesidade (76). Por outro lado, hiperinsulinemia reduziu a capacidade supressora de células Tregs através da inibição da produção de IL-10 sem afetar, no entanto, a expressão de CTLA-4, TGF- β ou CD39 na superfície destas células (77). Em conjunto, estes dados apontam para o fato de que não apenas a frequência periférica de células Tregs estão alteradas, mas também suas funções supressoras e estas alterações podem ser essenciais para o desenvolvimento de eventos inflamatórios em comorbidades metabólicas na obesidade.

2.4.1 O papel das ectonucleotidases CD39 e CD73 na inflamação subclínica da obesidade

Genericamente, as enzimas que compõe o sistema purinérgico, controlando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, são denominados como ectonucleotidases. Diversas ectonucleotidases foram descritas até o presente momento, destacando-se a ação da ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase) e ecto-5'-nucleotidase. As NTPDases convertem nucleotídeos trifosfatados (ATP) e difosfatados (ADP) em adenosina monofosfato (AMP) como produto final (78).

Apesar de 8 NTPDase serem identificadas até o momento, a NTPDase 1 (CD39) apresenta grande destaque na modulação da resposta imune. O CD39 foi primeiramente reconhecido como um marcador de ativação de linfócitos B e T, sendo identificada posteriormente em diversos outros tipos celulares (79). A expressão de CD39 na superfície celular de células TCD4⁺ e CD8⁺ também estão relacionadas a uma maior expressão do fator de transcrição NF- κ B, demonstrando o seu papel na resposta pró-inflamatória (80).

A desfosforilação de ATP e ADP em AMP é mediada por CD39, enquanto a ecto-5'-nucleotidase (CD73) converte AMP em adenosina (81). A adenosina induz efeitos inibitórios e anti-proliferativos através de quatro receptores: A1, A2A, A2B e A3, reduzindo a ativação e células T por células apresentadoras de antígenos (APCs), modificando a diferenciação e produção de citocinas por linfócitos (82). No entanto, a produção de adenosina via CD39-CD73 é inibida por altas concentrações de ATP e ADP, duas moléculas com maior atividade pró-inflamatória, e a superexpressão de CD39 em células T ativadas com caráter pró-inflamatório pode estar relacionado a uma ineficiência na metabolização destes nucleotídeos (83).

A combinação das proteínas de superfícies CD4, CD25 e CD39 foi utilizada por Dwyer e colaboradores (84) para identificar quatro subtipos de células CD4 no sangue periférico de humanos: CD4⁺CD25⁺CD39⁺ (célula Treg de memória/ativada; mTreg); CD4⁺CD25⁺CD39⁻ (pro-T auxiliar/ Th); CD4⁺CD25⁻CD39⁺ (células T de memória efetora; mTeff) e CD4⁺CD25⁻CD39⁻ (célula T virgem efetora; nTeff). Uma alta expressão de CD39⁺ em células CD4⁺CD25⁻ é identificada em tecidos inflamados e no sangue periférico de pacientes com doenças crônicas, como artrite reumatoide (80). Além disso, células mTeff CD4⁺CD25⁻CD39⁺ produzem altas concentrações de IL-17a e IFN- γ , estando associadas aos padrões Th1 e Th17 (84). Por outro lado, células mTreg CD4⁺CD25⁺CD39⁺ apresentam grande capacidade imunossupressora através da metabolização do ATP até adenosina através de CD39 e CD73 (85–87). Interessantemente, pacientes com rejeição de transplante renal apresentaram menores frequências de células mTreg CD4⁺CD25⁺CD39⁺ e uma alta frequência de células mTeff CD4⁺CD25⁻CD39⁺, indicando que estas subpopulações podem ser utilizadas para a avaliação do correto equilíbrio entre células imunossupressoras e pró-inflamatórias (88). Por outro lado, a expressão de CD73 na superfície células de células T CD4⁺CD25⁺ é reduzida, enquanto altos níveis intracelulares desse marcador são identificados. Dados recentes apontam para uma translocação de CD73 para a superfície celular de Treg em situações de imunossupressão (85).

Uma alta expressão de CD39 e CD73 é identificada em células Tregs FoxP3+, e a atividade destas ectonucleotidases é sincronizada de acordo com o status de ativação celular (89). Os efeitos inibitórios da adenosina gerada pela ação de ectonucleotidases em células Tregs podem ser decorrentes de mecanismos autócrinos e paracrinos. O aumento da expressão de CD39+ em células CD4+CD25^{high} permite a migração celular para o tecido inflamado, onde reduz os níveis extracelulares de ATP e a via de morte de células Tregs pelo receptor P2 (90). A adenosina gerada por células Tregs também apresenta alta afinidade a receptores A2A de células T efectoras, reduzindo a ativação do NF-κB e a produção de citocinas pró-inflamatórias (91). Além disso, Ohta e colaboradores (92) demonstraram que células Tregs também são capazes de captar a adenosina por receptores A2A, aumentando sua atividade imunorreguladora e supressora através de maior expressão de moléculas inibitórias, como o CTLA-4, e produção de citocinas anti-inflamatórias. Em humanos, 90% de células CD4+FoxP3+ expressam CD39+, enquanto a expressão de CD73+ é insignificante. Porém o CD73+ pode translocar-se do citoplasma para a membrana celular para o aumento da atividade imunoreguladora (85).

A participação do sistema purinérgico na inflamação crônica de indivíduos obesos vem ganhando destaque recente. Pandolfi et al (93) demonstraram um grande acúmulo de ATP no tecido adiposo visceral de indivíduos obesos metabolicamente não-saudáveis em comparação ao tecido adiposo de indivíduos obesos metabolicamente saudáveis. Neste trabalho, uma alta expressão de CD39+ e CD73+ em células imunes CD45PAN+ de indivíduos obesos metabolicamente não-saudáveis foi associada a uma maior ativação da via NLRP3-inflamassoma e maior produção de IL-1β em comparação a obesos metabolicamente saudáveis e eutróficos saudáveis (93). Em um estudo posterior, células CD4+CD39+ foram associadas ao padrão Th17 no tecido adiposo de obesos metabolicamente não-saudáveis, apresentando maior expressão do fator de transcrição RORC e citocinas IL-17 e IL-23 em conjunto a menor frequência de células CD4+CD39+FoxP3+ e CD4+CD39-Foxp3+ (94).

No entanto, desregulações na expressão de CD39 e CD73 também apresentam importantes efeitos na redução da atividade imunossupressora na obesidade. No tecido adiposo de indivíduos com sobrepeso, uma menor frequência de células CD4+CD39+FoxP3+ foi associada a maiores níveis de IMC (95). Isto pode indicar que a baixa capacidade imunossupressora de células Tregs está associada a uma menor expressão de ectonucleotidases, sobretudo CD39, e consequentemente uma baixa metabolização do ATP até adenosina, o principal substrato imunossupressor utilizado por Treg.

Em particular, a adenosina exerce um importante papel nas propriedades imunossupressoras de células Tregs, as quais metabolizam ATP e ADP em adenosina no espaço extracelular, inibindo o sistema imune localmente (87,96). Além disso, as funções efectoras da adenosina através do aumento do AMPciclístico estão associados ao aumento da expressão de CD25, antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e FOXP3 (97,98). Além disso, em indivíduos com diabetes tipo 2, uma alta frequência de células CD4+CD39+ foi positivamente associada aos níveis de hemoglobina glicada e glicose plasmática de jejum (99). Por outro lado, uma correlação inversa foi encontrada entre a expressão de CD39 na superfície de células Tregs e a massa corporal de indivíduos obesos (100).

Assim, um correto balanço entre CD39 e CD73 na superfície de células CD4+CD25- e CD4+CD25+ é necessário para o controle da resposta inflamatória. Guzman-Flores e colaboradores (101) reportaram que indivíduos obesos e diabéticos apresentam uma alta expressão de CD39+ e uma baixa expressão de CD73+ em células CD4+CD25^{High} quando comparados a eutróficos, além de uma alta expressão do receptor de adenosina A2A e de CD39 na superfície de linfócitos T, B e monócitos CD14+. No entanto, os indivíduos obesos apresentavam uma média de idade avançada em comparação aos indivíduos eutróficos, impedindo comparações diretas entre os grupos.

2.5 Alterações epigenéticas em histonas de células imunes na obesidade

A epigenética é definida como alterações na expressão de genes que independem de alterações no genótipo. As bases moleculares da epigenética são complexas e envolvem dentre outros fatores, modificações em histonas, metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA), posicionamento de variantes de histonas, e a regulação gênica por ácidos ribonucleicos (RNA) não codificantes, que modificam a conformação da cromatina e governam a expressão gênica (102,103). As modificações epigenéticas são potencialmente reversíveis, e assim o entendimento destas modificações podem proporcionar novos alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças. A metilação do DNA é um dos eventos de modificações epigenéticas comumente estudados, estando associado a repressão da transcrição gênica (11,103). No entanto, dados emergentes indicam que alterações na estrutura da cromatina decorrentes da interação do indivíduo com o ambiente exercem grande impacto na regulação da transcrição gênica da resposta imune (104).

Basicamente, a estrutura da cromatina consiste na dupla fita de DNA em espiral que se enrola em torno de um octâmero proteico formado por quatro pares de histonas: H2A, H2B, H3 e H4 (104). As histonas podem sofrer diversas modificações em sua cauda N-terminal, incluindo acetilação, fosforilação, metilação e ubiquitinação, em sítios específicos, como a lisina 9 na histona H3 (H3K9). A modificação na estrutura de histonas, como por exemplo, a adição de um grupo acetil, pode remodelar a cromatina tornando-a mais ou menos compacta de modo a influenciar o processo de transcrição gênica (103). O estado dinâmico de acetilação e desacetilação de histonas possui regulação enzimática através da atividade das enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC), respectivamente(105).

A HAT catalisa a adição do grupo acetil da molécula doadora acetil-coenzima A (acetil-CoA) e as lisina (K) na cauda N-terminal das histonas, neutralizando a carga positiva das extremidades e enfraquecendo a ligação com o DNA (106). Este processo causa o relaxamento da estrutura da cromatina, facilitando a ação de fatores transcricionais e o aumento da expressão gênica (105). De fato, a resposta inflamatória e o aumento na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, bem como da proliferação e maturação celular, estão relacionados ao aumento da atividade da HAT e de acetilação em sítios específicos (102,107). Por exemplo, as HATs *CREB-binding protein CBP* e o seu homólogo p300 induzem modificações de acetilações em sítios como H3K4 e H3K39 (108).

Neste sentido, a homeostase de monócitos/macrófagos é regulada por modificações em histonas. A sinalização de TLR induz a acetilação de genes de citocinas pró-inflamatórias (109). A acetilação de resíduos de lisina na cauda da histona é reconhecido por proteínas *bromodomain and extraterminal* (BET), sobretudo pela proteína Brd4, aos quais contribuem para a transcrição de genes de citocinas inflamatórias por formarem um complexo de transcrição em conjunto a RNA polimerase II (102,109). A região promotora de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-8 e TNF- α , é rapidamente acetilada por CBP/p300, levando a uma alta atividade transcricional. A polarização de monócitos/macrófagos para o fenótipo pró-inflamatório é mediado por modificações na estrutura da cromatina, sendo identificada uma alta taxa de acetilação nas histonas H3 e H4 (12,110). A estimulação por INF- γ *in vitro* em monócitos induziu uma maior acetilação da histona H4 na região promotora do gene do TNF- α (110). A acetilação de histonas também coordenada a fosforilação e maior atividade do NF- κ B para a resposta inflamatória, facilitando a polarização de macrófagos para o perfil M1 (111,112). Além disso, outras funções imunes, como migração celular e hematopoiese também apresentam alta taxa de acetilação em histonas de regiões promotoras específicas (107).

Por outro lado, as HDACs promovem a desacetilação de histonas, ligando-se fortemente ao DNA e tornando a estrutura da cromatina mais compacta, o que contribui para o silenciamento gênico (107). Neste sentido, a ação anti-inflamatória de glicorticóides está relacionada a uma maior atividade da HDAC2, que retira o grupamento acetil de histonas H3 e H4, promovendo maior repressão na fosforilação do NF- κ B e transcrição de citocinas pró-inflamatórias (102).

A obesidade apresenta grande impacto sobre a regulação epigenética de genes inflamatórios e na atividade funcional de células imunes. Novamente, a metilação de DNA é o evento epigenéticos em leucócitos periféricos com maior corpo de evidências. Em um estudo pioneiro, foi identificada alteração nos níveis de metilação nos genes UBASH3B e TRIM3, envolvidos na regulação de funções como proliferação de células T e diferenciação de macrófagos (113). Por outro lado, a região promotora do gene do TNF- α em células mononucleares periféricas encontra-se hipometilada em indivíduos obesos, sugerindo maior atividade transcricional desta citocina (114). Além disso, o gene do fator de transcrição FoxP3 encontra-se hipermetilado em células T de indivíduos obesos, reduzindo a atividade imunossupressora de células Tregs (115).

A saúde metabólica de indivíduos obesos também apresenta grande influência sobre características epigenéticas de leucócitos periféricos, sendo identificada uma correlação negativa entre a metilação global do DNA de células mononucleares e a severidade da resistência insulínica (116). Neste sentido, níveis elevados de ácidos graxos saturados foram relacionados a uma maior atividade da enzima DNMT3B, responsável pela desmetilação do DNA, em macrófagos de indivíduos obesos, resultando em maior polarização para o fenótipo M1 (117).

Monócitos de indivíduos obesos com diabetes tipo 2 exibem um estado de hiperacetilação na histona H3 nas regiões promotoras do TNF- α e da ciclooxygenase (COX), contribuindo para maior fosforilação e atividade do NF- κ B nos sítios promotores de genes inflamatórios (118). Além disso, células mononucleares de indivíduos obesos apresentam uma baixa expressão da enzima HDAC4, o que correlacionou inversamente com os níveis sistêmicos de proteína secretada e regulada pela ativação de linfócitos T (RANTES/CCL5) (119). De modo interessante, o aumento da atividade da HDAC4 após um período de treinamento físico inibiu a ativação do NF- κ B induzida pelo TNF- α , confirmando o papel crucial de eventos epigenéticos no desenvolvimento da inflamação crônica (119). Adipocinas exercem grande papel de ativação de células imunes inatas e adaptativas, estando relacionadas a uma maior atividade inflamatória. Neste sentido, a leptina parece exercer um papel

fundamental na acetilação da histona H4, sugerindo papel crucial em vias de sinalização e transcrição como p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK1/2, NF- κ B, and p300, reconhecidos pela participação na inflamação (120).

2.6 Efeitos imunoreguladores agudos do exercício físico

O exercício físico, a cada sessão pode exercer grandes efeitos imunomodulatórios. Estes efeitos são dependentes do tipo de exercício, volume da sessão, intensidade, metabolismo energético envolvido, grupos musculares e o nível de condicionamento físico do praticante (20). Além disso, modificações neuro-hormonais, cardiovasculares e neuromusculares apresentam forte influência sobre o sistema imune durante e após o exercício (121). As primeiras evidências obtidas em 1893 indicavam uma grande leucocitose, caracterizada por uma mobilização de neutrófilos, monócitos e linfócitos para a corrente sanguínea, durante uma sessão de exercício (121).

A leucocitose induzida pelo exercício é estimulada, sobretudo, por alterações neuroendócrinas e cardiovasculares, as quais comumente também modula a leucopenia observada horas após a sessão de exercício (121,122). Uma vez que alterações hormonais e na resposta cardiovascular são intensidade-dependente, a mobilização celular seguirá um padrão similar. Com o início do exercício, a sinalização neuroendócrina reduz a atividade parassimpática em paralelo a um aumento progressivo na liberação de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal através de terminais de nervos simpáticos para a circulação (123). Em conjunto, outros hormônios, como cortisol e glucagon, também são liberados por seus respectivos órgãos (123). A descarga catecolaminérgica inicial causa modificações fisiológicas que auxiliam na reação ao estresse físico induzido pelo exercício, através de maior liberação de substratos energéticos e consequente captação, aumento da frequência cardíaca, vasodilatação na musculatura ativa e tecido hepático, e vasoconstrição de artérias e veias em órgãos não-ativos no exercício (124). A leucocitose é induzida por um aumento no fluxo sanguíneo, mobilização de linfócitos em linfonodos secundários, hematopoiese e demarginação de leucócitos da parede endotelial (20,125,126). Como mencionado, a intensidade do exercício determinará a magnitude da resposta catecolaminérgica e leucocitose, exercendo também influência sobre a expressão de moléculas de adesão e modificações no endotélio vascular.

De modo geral, durante e imediatamente após uma sessão de exercício intenso, o número de granulócitos, monócitos e linfócitos no sangue periférico torna-se elevado, assim como alguns aspectos funcionais da imunovigilância, como a fagocitose e citotoxicidade (121). Enquanto o aumento no número de leucócitos circulantes é um indicativo de episódios de infecção/inflamação, a leucocitose induzida pelo exercício é conhecida por ser um fenômeno transitório e os valores de células imunes no sangue, em geral, retornam aos valores basais em um período de até 24 h após o término da sessão. As células mobilizadas predominantemente durante o exercício são linfócitos e neutrófilos, com monócitos apresentando uma pequena contribuição (20,127). Durante os estágios iniciais de recuperação após o exercício, uma rápida queda na contagem total de linfócitos (denominada linfopenia) é identificada de modo concomitante a episódios de neutrofilia, isto é, aumento na contagem de neutrófilos (128). A queda na contagem de linfócitos está relacionada a uma teoria da janela aberta, onde sinais e sintomas clínicos demonstram uma maior pré-disposição à infecções respiratórias (129).

Enquanto o exercício induz uma leucocitose generalizada, as respostas de subtipos celulares de monócitos e linfócitos apresenta grande heterogeneidade. Há três principais eventos que determinam a mobilização preferencial de alguns subtipos de leucócitos durante o exercício agudo. Primeiro, o exercício mobiliza células que apresentam uma função efetora com atividade citotóxica aumentada, e apresenta um fenótipo maduro/diferenciado. Neste sentido, o exercício mobiliza células citotóxicas como células Natural Killers (NK) ativadas, células CD8⁺ de memória e células T $\gamma\delta$, e monócitos CD16⁺. Por outro lado, subtipos celulares com menor perfil efetor ou em estágios anteriores de maturação, como células CD4⁺, células B e monócitos clássicos (CD16⁻) são redistribuídos em menor escala (130–132). Porém, tanto células T CD8⁺ quanto CD4⁺ apresentam um padrão de redistribuição preferencial para o fenótipo com maior atividade efetora/citotoxicidade, que expressam KLRG1⁺/CD28⁻/CCR7⁻ (133). Em segundo lugar, os subtipos celulares mobilizados durante o exercício tendem a apresentar um fenótipo associado a maior migração tecidual. De fato, o exercício mobiliza células T e monócitos que expressam altos níveis de integrinas e moléculas de adesão intracelular, bem como uma variedade de receptores de quimiocinas (CCR5, CXCR2, CXCR3) que possuem grande ligação ao endotélio ativado e alto potencial quimiotático(134–136). Por fim, os subtipos de leucócitos que são preferencialmente mobilizados apresentam altos níveis de receptores β -adrenérgicos (β 2-ARs) e receptores de glicocorticoides, e assim são altamente responsivos a catecolaminas e ao cortisol (122,126).

Assim, a descarga catecolaminérgica durante o exercício mobiliza células imunes efetoras, enquanto que a redistribuição celular pós-exercício é altamente responsiva a glicocorticoides.

2.6.1 Resposta de monócitos ao exercício agudo

Em relação aos monócitos, ocorre maior mobilização aguda de monócitos CD14+CD16+ e CD14-CD16+, com discreta elevação na frequência de monócitos CD14+CD16- (137). A intensidade do exercício é determinante para as modificações celular e de atividade funcional destes monócitos. Embora exercícios de intensidade moderada (intensidade entre 60 – 75% da capacidade máxima, identificada através da FCMax ou do VO2Max) e exercícios de alta intensidade (intensidade > 80% da capacidade máxima) induzam uma mobilização de monócitos de modo similar, exercícios de alta intensidade ou intervalado de alta intensidade parecem apresentar maior magnitude de mobilização (132,138). Sessões de exercício extenuante, realizados até a fadiga do indivíduo, também apresentam grande potencial de mobilização de monócitos com fenótipo pró-inflamatório, em particular CD14+CD16+, devido ao grande dano tecidual induzido pela sessão de exercício (139). Por outro lado, a presença de obesidade ou síndrome metabólica não parecem estimular uma mobilização adicional de monócitos intermediários e não-clássicos durante sessões de exercício intervalado de alta intensidade ou exercícios de intensidade moderada (140,141).

No entanto, o exercício agudo é capaz também de modular a expressão de diversos tipos de receptores de padrões moleculares da família TLR, sobretudo TLR-2 e -4, na superfície de monócitos (142). Além disso, uma menor produção de TNF- α por células mononucleares estimuladas com LPS foi identificado após uma sessão de exercício de alta intensidade (143). Mais uma vez, a interação imunoendócrina parece mediar os efeitos de redução na expressão de TLR-4 e produção de citocinas pró-inflamatórias após o exercício, uma vez que o bloqueio de receptores beta-adrenérgicos-2 (β -AR2) na superfície de monócitos estimulou uma maior produção de TNF- α (144). De modo interessante, o bloqueio seletivo de receptores adrenérgicos parecem modular a resposta inflamatória de monócitos de modo diferencial. Neste sentido, da Silva Rossato et al (145) demonstraram que o bloqueio de receptores adrenérgicos α 1 em animais exercitados resultou no aumento da taxa de fagocitose, produção de óxido nítrico (NO) e na expressão de proteína de choque térmico de 70 kda (HSP70) em monócitos. Além disso, outros fatores como a presença de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs, *danger associated molecular patterns*), o conteúdo intracelular e extracelular de HSPs e o conteúdo circulante de produtos bacterianos também

parecem modular a atividade funcional de monócitos após o exercício (144). O exercício agudo reduziu a expressão de CD62L, CXCR2, CD11b e HLA-DR na superfície de monócitos intermediários e não-clássicos (146). Por outro lado, o exercício agudo estimulou uma maior expressão de CCR2 (ligante de quimiocinas como CCL2, CCL7, CCL8) na superfície de monócitos CD14+ e a sua atividade quimiotática (134).

O exercício exaustivo aumenta a expressão de TLR-4 em monócitos CD14+CD16+ e CD14-CD16+, e a consequente produção de citocinas pró-inflamatórias por células estimuladas (139,143). Nesta modalidade de exercício, o aumento descontrolado de uma série de fatores, como o dano muscular excessivo, a geração de espécies reativas de oxigênio e a endotoxemia sistêmica, estão relacionados a maiores níveis de IL-1 β e TNF- α no plasma (147). Em conjunto ao dano muscular, a translocação microbiana, avaliada geralmente através da mensuração dos níveis sistêmicos de LPS, também está associada a uma ativação de células imunes inatas (neutrófilos e monócitos) e maior produção de citocinas pró-inflamatórias (148). Neste sentido, um aumento médio de 30 vezes nos níveis de citocinas inflamatórias foi identificado em atletas que relataram grande desconforto gastrointestinal e apresentaram elevados níveis de LPS (121).

2.6.2 Resposta de linfócitos T ao exercício agudo

Linfócitos T apresentam grande responsividade ao exercício agudo. Similar aos outros leucócitos, o volume, intensidade e magnitude de dano tecidual alteram o padrão de mobilização de células T (20). Em relação à frequência total de linfócitos, células CD8+ apresentam maior magnitude de mobilização e redistribuição em resposta a uma sessão de exercício (2 – 3x), enquanto uma elevação de menor magnitude é identificada em células CD4+ (1.5 – 2x) (128). Como já descrito anteriormente, a mobilização de células CD4+ e CD8+ durante o exercício é mediada por mecanismos adrenérgicos, e a grande descarga de catecolaminas durante a sessão de exercício é responsável por ativar células T, de modo a aumentar a linfopoiese do timo e a mobilização de células T com fenótipo efetor de linfonodos secundários (149,150). Além disso, a mobilização de linfócitos é realizada, ao menos em parte, por um aumento na força de cisalhamento do sangue periférico sobre o endotélio vascular e o aumento do débito cardíaco e pressão arterial, e após o término do exercício, a resposta clássica de linfopenia é visualizada em um período de até 6-h após a sessão (121).

Enquanto que a visão inicial de queda na contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ esteve relacionada a uma maior possibilidade de infecções de trato respiratório, em uma teoria denominada “Teoria da Janela Aberta”, em conjunto a reduções nos níveis de imunoglobulina A (IgA) (151). Por outro lado, teorias e novas evidências demonstram que a queda transitória na contagem de linfócitos e a modificação do fenótipo das células induzidas pelo exercício podem estar relacionadas a uma maior atividade funcional. De fato, Kruger e colaboradores (149), utilizando células fluorescentes marcadas, demonstraram que células T são redistribuídas em grande escala para tecidos periféricos, incluindo intestino e pulmões após o exercício. Acredita-se que a redistribuição é acompanhada por um aumento na atividade funcional de células T em tecidos onde patógenos são comumente identificados. Esta resposta imune adaptativa ao exercício mantém a homeostase imunológica através de uma maior atividade reguladora.

Exercícios de alta intensidade apresentam grande impacto na mobilização e redistribuição de células T durante e após a sessão. Após o exercício moderado (75% da capacidade máxima), uma grande frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ em apoptose foram identificadas (152,153). Por outro lado, o exercício de alta intensidade (100% da capacidade máxima até exaustão) induziu uma maior capacidade de migração de células T CD4⁺ e CD8⁺, porém menor expressão de ANEXINA V (marcador de apoptose), como identificado pela expressão de CX3CR1 (receptor da quimiocina CX3CL1/fractalkina) nestas células (154). O exercício de alta intensidade estimula uma maior mobilização de células CD4⁺ e CD8⁺ com fenótipo senescente, identificados como CD28-CD57⁺KLRG1⁺, e uma consequente queda na frequência destas células em um período de 1 hora após a sessão (155). Por outro lado, linfócitos T virgens apresentam apenas uma pequena mobilização e redistribuição em resposta ao exercício. Neste contexto, a mobilização de células na medula óssea e a apoptose de células T senescentes estimula a produção/mobilização de novas células progenitoras para a circulação (151).

Uma teoria denominada “exercício faz espaço imune” aponta que o exercício físico poderia conter a imunossenescência precoce de indivíduos obesos e/ou com baixo nível de atividade física, através da indução de apoptose de linfócitos T de memória em exaustão circulantes e o aumento na frequência periférica de linfócitos T virgens (156). Assim, tem sido proposto que três processos participam deste efeito: a) as células T de fenótipo de diferenciação em último estágio são mobilizadas para o sangue periférico durante o exercício em maior proporção em relação a linfócitos T com outros fenótipos; b) estas células mobilizadas extravasam do sangue, direcionando-se para tecidos periféricos e/ou inflamados

(como o tecido muscular ativo durante o exercício) 1-2 h após a sessão de exercício. Aqui, é proposto que uma série de estímulos pró-apoptóticos (espécies reativas de oxigênio, glicorticóides, citocinas) podem induzir apoptose dessas células (156). Este pressuposto é parcialmente suportado por estudos em camundongos que demonstram apoptose de linfócitos T em tecidos periféricos horas após o exercício (149); c) O repertório de células T é capaz de expandir em resposta ao “espaço imunológico” que foi criado, devido à redução na frequência de células T em exaustão, uma vez que o feedback negativo que controla o número de células T de memória e virgens na circulação está reduzido (156). Além disso, sugere-se que fatores sistêmicos liberados pelo exercício, como a IL-7, podem induzir timopoiese e o desenvolvimento extra tímico de células T em tecidos como o fígado. Contudo, alguns aspectos dessa teoria ainda são alvos de intenso debate. Kruger e colaboradores (153) demonstraram uma maior taxa de apoptose em células T com alta diferenciação (CD28-CD57+) após uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade em comparação ao exercício moderado contínuo.

O padrão de resposta de células T CD4+ em relação ao seu fenótipo apresenta comportamento semelhante. Em uma revisão sistemática, Zhao e colaboradores (157) identificaram que o exercício moderado estimula o perfil Th1 pró-inflamatório, como visualizado pelo aumento de células T CD4+ que expressam IFN- γ e a maior expressão do fator de transcrição Tbet. Por outro lado, o exercício de alta intensidade apresenta maior indução de resposta Th2, como visualizado por uma maior expressão do fator de transcrição GATA3 e na frequência de células CD4+IL-4+, relacionada a uma maior atividade humoral e anti-inflamatória (158). De fato, a estimulação de receptores β 2-ARs em células CD4+ leva a uma inibição na secreção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a polarização de células CD4+ para o fenótipo Th2 (159). A modulação do fenótipo de células T CD4+ será dependente da concentração de citocinas no ambiente, o estágio de maturação de linfócitos T e da intensidade do estresse induzido pelo exercício físico. Após uma sessão de exercício realizado a 90% do limiar ventilatório durante 2 horas, Kakanis e colaboradores (160) identificaram um aumento nos níveis de IL-4 e IL-10, sem modificações nas concentrações de TNF- α , IL-2 e IL-17. Os autores concluíram que o exercício modifica o balanço de citocinas associadas ao padrão de resposta Th2-T regulatório. Além disso, outras atividades funcionais de linfócitos T também são modificadas em resposta a uma sessão de exercício. Um estudo de meta-análise concluiu que a proliferação de linfócitos T é suprimida após uma sessão de exercício em até 1 h após a sessão, sendo independente a intensidade (161).

Os efeitos anti-inflamatórios do exercício são, pelo menos em parte, atribuídos a modificações na composição de subtipos de células T CD4+, sobretudo por uma mobilização de células Treg em resposta ao exercício (19). No entanto, os dados obtidos até o momento são conflitantes. Em estudos envolvendo camundongos, o exercício estimula uma maior frequência de linfócitos Tregs identificados pelos marcadores CD4+CD25^{bright}, CD4+CD25^{bright}FoxP3+, CD4+FoxP3+ (162–164). Em humanos, o exercício moderado contínuo não modificou a frequência de linfócitos CD4+CD25+CD127^{low} (16), enquanto uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade induziu a um aumento na frequência de células Tregs CD4+FoxP3+ e CD4+CD25+CD127^{low} (165,166). Já o exercício máximo, realizado através de um teste incremental até a exaustão, aumentou a frequência absoluta de células Tregs e a expressão de FoxP3 e TGF- β em células mononucleares de idosos (167). Por outro lado, células Tregs apresentam uma resposta bifásica após o exercício prolongado e extenuante, sendo identificado uma queda na frequência periférica imediatamente após seguido por uma elevação acima dos níveis basais no período de 24 h após a sessão (168). A elevação de linfócitos Tregs de memória, identificados através do fenótipo de células CD4+CD127^{low}HLA-DR+CD45RA-, 24-h após o exercício exaustivo foi relacionado a uma resposta compensatória para limitar a resposta inflamatória induzida pelo dano tecidual (168).

2.6.3 Resposta de citocinas ao exercício agudo

Os níveis sistêmicos de citocinas, bem como a produção destas glicoproteínas por células imunes, são modulados por uma série de fatores fisiológicos associados a intensidade do exercício, como a descarga adrenérgica, níveis de glicocorticoides, substratos metabólicos (glicose, ácidos graxos livres, glutamina), estresse oxidativo e outros (169). O tecido músculo esquelético é uma das principais fontes de produção de citocinas durante o exercício. Ostrowski e colaboradores (170) demonstraram um aumento na expressão de RNAm de IL-6, mas não de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , em tecido muscular de atletas de alto nível imediatamente após e 2 horas após uma maratona (42km). Os autores também identificaram uma ausência na produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β por células mononucleares após a maratona. Em indivíduos saudáveis fisicamente ativos, durante o exercício moderado (em intensidade de 65-75%VO₂Max) e intenso (intensidade de 80-100%VO₂Max), o NF- κ B é inativado ou apresenta baixa taxa de fosforilação, de modo a reduzir a atividade de transcrição de genes pró-inflamatórios e a produção de citocinas (171). Por outro lado, a

contração muscular durante o exercício físico ativa uma via intracelular dependente do aumento das concentrações intracelulares de cálcio, conhecida como a via da calcineurina, que estimula a transcrição e produção de citocinas por este tecido (172).

Assim, as crescentes evidências das décadas de 1990 e 2000 demonstraram que o tecido muscular é uma importante fonte de produção de citocinas durante o exercício e foram denominadas miocinas (173). A IL-6 foi a miocina com maior caracterização de suas atividades funcionais até o presente momento. Diversos fatores modulam os níveis da IL-6 após exercício, sendo que provas extenuantes, como maratonas, podem induzir um aumento na ordem de 100 vezes nas concentrações plasmáticas de IL-6 em indivíduos saudáveis. Outros princípios da prescrição do exercício, como o volume, a intensidade, e a mobilização de massa muscular também apresentam uma relação direta com o aumento de IL-6 pós sessão de exercício (172,174).

Em relação a sua atividade funcional, a produção de miocinas, sobretudo a IL-6, durante e após o exercício suprime a produção de TNF- α e IL-1 β por células mononucleares periféricas estimuladas por LPS em experimentos *in vitro* (173). Além disso, o incremento de IL-6 plasmático após o exercício precede e estimula a produção de diversas citocinas anti-inflamatórias, sobretudo a citocina antagonista ao receptor da IL-1 (IL-1ra) e a IL-10, além da forma solúvel de receptores do TNF- α , TNF-R, que atuam através de uma inibição competitiva ao TNF- α (175,176).

Além de seus efeitos imunomodulatórios, a IL-6 e outras miocinas secretadas durante o exercício apresentam importantes atividades metabólicas em tecidos periféricos, como o aumento da lipólise no tecido adiposo, o aumento da glicogenólise pelo fígado, e o aumento da oxidação de ácidos graxos e da captação de glicose pelo tecido muscular através de um mecanismo que envolve o sensor energético proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (177). O exercício de alta intensidade (por exemplo, intensidades acima de 85%VO₂Max durante 1 h ou mais; exercício intervalado de alta intensidade, caracterizado por alternância de estímulos de alta intensidade com períodos breves de recuperação) recrutam maior quantidade de massa muscular e apresentam maior depleção de glicogênio intracelular, o que leva a uma maior produção de IL-6 e outras miocinas. A IL-6 também apresentam grande associação com a elevação de glicocorticoides, sobretudo o cortisol, e a secreção de hormônios supra-adenais, como as catecolaminas, durante o exercício (174).

Dentre as citocinas anti-inflamatórias influenciadas por protocolos de exercícios de alta intensidade, a IL-1RA e a IL-10 recebem maior destaque devido aos seus efeitos imunomodulatórios. A IL-1RA inibe a transdução do sinal da interação da IL-1 β e seu

receptor, reduzindo a ativação do NF- κ B e a geração de espécies reativas de oxigênio (178). Já o aumento da IL-10 sistêmica, secretada sobretudo por linfócitos T reguladores em resposta ao aumento de IL-6 sistêmico, reduz uma série de funções de células apresentadoras de antígeno (APC), como a expressão do MHC e moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) (179). Também é capaz de inibir a produção de citocinas dos padrões Th1 e Th17, padrões caracterizados por estimularem a inflamação, além de reduzir a taxa de proliferação destas células (180). Nosso grupo demonstrou que o aumento nos níveis sistêmicos de IL-10 apresentou uma correlação negativa com os níveis de CXCL-8 após uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade (181). Em conjunto, estes dados demonstram um alto impacto do exercício de alta intensidade na indução de resposta anti-inflamatória.

Exercícios de alta intensidade aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias e inibem, ao menos temporariamente, uma série de atividades funcionais do sistema imune, como o reconhecimento de patógenos por TLR-4 e a quimiotaxia de neutrófilos, estimulando uma resposta de imunidade humoral, com maior proteção contra helmintos e fungos (182). Em relação a imunidade adaptativa, uma sessão de exercício de alta intensidade (>80% da capacidade máxima) aumenta a expressão de genes relacionados ao padrão de imunidade anti-inflamatória Th2, GATA3, e a expressão do principal fator de transcrição de células Tregs, o FoxP3, em indivíduos saudáveis e atletas (183,184). A elevação da frequência de células T com fenótipo Th2 e de células Tregs está relacionada ao aumento da expressão e produção de IL-4 e IL-10 por estas células, modificando o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias produzidas e secretadas por células da imunidade adaptativa (185). Além disso, sessões de exercício com intensidades acima de 80% da capacidade máxima ou em intensidades próximas do segundo limiar ventilatório (em torno de 85% da capacidade cardiopulmonar máxima) reduzem a capacidade de produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β por monócitos estimulados por LPS (138).

Por outro lado, diversos trabalhos demonstraram que o exercício moderado estimula uma resposta imune celular mais intensa com produção de citocinas pró-inflamatórias e melhor proteção contra vírus e bactérias. Esta teoria é suportada por estudos com camundongos, onde o exercício moderado aumentou a resposta pró-inflamatória e a imunidade celular contra vírus, bactérias e protozoários (ex., *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*) (186). Em humanos, uma sessão de exercício moderado (1 hora, 70%VO₂Max) aumentou os níveis séricos de TNF- α e da quimiocina CXCL16 (183,185). Além disso, este protocolo de exercício estimulou a transcrição gênica de diversos fatores relacionados a resposta pró-inflamatória em células mononucleares periféricas, como citocinas (IL-1 β , TNF-

α , CXCL-8), TLR2 e TLR-4, e o fator de transcrição TBX21 (T-box expressed in T cells, or Tbet) que controla a expressão de IFN- γ e o desenvolvimento inicial para o padrão Th1.

O aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes também é observado após sessões de exercícios exaustivos ou extenuantes. Nesta modalidade de exercício, o aumento descontrolado de uma série de fatores, como o dano muscular excessivo, a geração de espécies reativas de oxigênio e a endotoxemia sistêmica, estão relacionados a maiores níveis de IL-1 β e TNF- α no plasma (22,147).

2.7 Adaptações crônicas do sistema imune ao exercício físico

De modo similar a obesidade, a inatividade física é o principal fator de risco para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, sobretudo de ordem metabólica e cardiovascular, com um importante mecanismo patogênico relacionado à inflamação subclínica (14). De fato, uma recente revisão de Booth e colaboradores (13) identificou que níveis reduzidos de atividade física estão associados a um espectro de 38 doenças crônicas. O mecanismo primário para a ligação entre inatividade física e inflamação está no fato de que a redução do gasto calórico diário induz acúmulo de tecido adiposo visceral e alterações relacionadas à lipotoxicidade e glicotoxicidade de modo independente ao nível do IMC (187–189). O acúmulo de adiposidade central em indivíduos sedentários é acompanhado por maior infiltração de macrófagos M1, maior liberação de adipocinas e a geração de um ambiente pró-inflamatório similar ao encontrado em indivíduos obesos (190).

No entanto, a associação entre a inatividade física e a inflamação crônica ocorre também em vias independentes conteúdo de adiposidade visceral. Níveis sistêmicos elevados de PCR, IL-6 e TNF- α são associados com comportamento sedentário e baixa capacidade funcional de modo independente a medidas de adiposidade central (19,191–193). Recentemente, um estudo preliminar com 15 indivíduos com diferentes níveis de aptidão cardiorrespiratória (7 indivíduos com baixo consumo máximo de oxigênio e 8 indivíduos com alto consumo máximo de oxigênio) identificou que aproximadamente 25% das células T CD4⁺ de indivíduos sedentários expressavam PD-1, enquanto indivíduos fisicamente ativos apresentavam menor frequência de expressão de PD-1 (16% em média) (133).

Evidências epidemiológicas demonstram que níveis elevados de atividade física diária e de condicionamento físico estão associados a menores taxa de infecções virais e bacterianas, além de menor desenvolvimento de doenças crônicas (18). O engajamento em programas de exercício sistemático modificam parâmetros de imunidade celular e humoral, adaptando o

sistema imune (194). É importante ressaltar que a maior parte das evidências demonstrando o papel do treinamento físico e da aptidão física sobre o sistema imune foram obtidos a partir de estudos observacionais de caráter transversal. Diversos instrumentos e medidas são adotados nestes estudos, destacando-se a avaliação de acelerômetros, utilização de questionários, equação para determinação da capacidade física ou gasto calórico semanal e testes máximos e submáximos para avaliação da força muscular e da capacidade cardiorrespiratória.

O VO_{2Max} é considerada uma medida “padrão ouro” para avaliar a aptidão cardiorrespiratória, sendo um indicativo da máxima eficiência dos sistemas respiratório, cardiovascular e neuromuscular e identificado através de um teste cardiopulmonar máximo envolvendo a análise de troca de gases (oxigênio, O_2 ; dióxido de carbono, CO_2) entre o paciente e o meio externo (195,196). O VO_{2Max} também pode ser interpretado através da equação de Fick, onde o VO_2 é igual ao débito cardíaco multiplica pela diferença arteriovenosa de O_2 $[(DC) \times (DifA_{O_2} - V_{O_2})]$ e expresso de forma absoluta através de L/min, ou relativa a massa corporal através de mL/kg/min (197). A capacidade cardiorrespiratória apresenta importante associação com a qualidade de vida, expectativa de vida e melhores desfechos metabólicos, sendo determinado por características genéticas e pela quantidade de atividade física e gasto calórico diário dispendido pelo indivíduo (196,198).

Duggal e colaboradores (199) identificaram que idosos classificados como “atletas masters”, que realizavam um alto nível de exercício físico diário, apresentavam uma atenuação em diversos parâmetros associados à imunossenescência. Desta forma, os autores descreveram que idosos atletas apresentavam um aumento na frequência de linfócitos T virgens ($CD45RA+CCR7+$), e reduções na frequência de T $CD8+$ e $CD4+$ de memória ($CD45RA-CCR7+$) e memória RA ($CD45RA+CCR7-$) em comparação a idosos sedentários, além de uma manutenção na capacidade tímica associada a altos níveis de IL-7 sistêmico e um aumento na razão $Th1/Th2$ ($CD4+IFN\gamma/CD4+IL-4+$) (199). Estes achados são semelhantes a dados prévios que identificaram que a capacidade cardiorrespiratória foi positivamente associada a uma maior frequência de linfócitos T virgens ($KLRG1-CD28+$), e negativamente associada a frequência de linfócitos T senescentes ($KLRG1+CD57+CD28-$) em uma coorte de indivíduos (15). Estas associações permaneceram significativas independentemente de infecções latentes (CMV, Epstein-barr ou herpes), idade e massa adiposa (15). Em conjunto, estes dados destacam o impacto do condicionamento físico sobre aspectos de imunossenescência.

A frequência periférica de linfócitos Tregs também é influenciada pela capacidade cardiorrespiratória. Handzlik e colaboradores (16) demonstraram que indivíduos fisicamente

ativos, com grande gasto calórico semanal, apresentavam maior frequência de células Tregs CD4+CD25+CD127- e maior produção de IL-10 por células estimuladas com múltiplos antígenos (por ex., difteria, tétano, poliomielite, influenza tipo B) do que indivíduos sedentários. Do mesmo modo, atletas olímpicos com maior VO2Max possuem maior frequência e atividade funcional de células Tregs (avaliada através da secreção de TGF- β e capacidade proliferativa) do que atletas olímpicos com menor capacidade cardiorrespiratória (200). Assim, o aumento da capacidade cardiorrespiratória, e não apenas o exercício físico, apresenta grande influência sobre o perfil de células T.

Monócitos de mulheres idosas fisicamente ativas apresentam menor expressão de TLR-4 em comparação a idosas sedentárias (201,202). Em indivíduos obesos, uma maior capacidade aeróbia foi associada com uma menor produção de TNF- α e IL-1 β por monócitos (203). Os autores demonstraram que a capacidade aeróbia protegeu contra a dessensibilização de receptores β -Ar de monócitos, um evento comum na obesidade (203). Glicocorticóides e hormônios catecolaminérgicos, após interação com o seu receptor e ativação de segundo mensageiro via proteína G, inibem a fosforilação do NF- κ B e a consequente transcrição de genes pró-inflamatórios (145,169). Desta forma, o aumento da capacidade aeróbia reduz o estado inflamatório crônico de indivíduos obesos através de mecanismos neuroendócrinos. Até o momento, não há dados avaliando o impacto do treinamento físico à longo prazo ou da aptidão cardiorrespiratória sobre os subtipos de monócitos. No entanto, uma análise transversal comparando idosos saudáveis fisicamente ativos e inativos indicou que idosos sedentários apresentam duas vezes mais monócitos CD14+CD16+ pró-inflamatórios no sangue periférico (204,205). Além disso, 12 semanas de treinamento físico regular reduziu a porcentagem de monócitos pró-inflamatórios e a produção de TNF- α por células estimuladas com LPS (204). De modo interessante, indivíduos treinados apresentam menores níveis sistêmicos de endotoxina em comparação a indivíduos sedentários, o que pode contribuir para uma menor estimulação crônica de TLR-4 de modo a reduzir a polarização de monócitos (206).

Diversas das adaptações descritas acima foram identificadas em indivíduos saudáveis e/ou eutróficos. Em indivíduos obesos, 10 sessões de exercício físico de intensidade moderada reduziram a expressão de CCR2 e CXCR2 em monócitos, enquanto o treinamento intervalado de alta intensidade aumentou a expressão de CCR5 em monócitos, neutrófilos e células T sem alterações no percentual de tecido adiposo corporal (207). O treinamento físico intenso por 10 semanas também aumentou a expressão de BDCA-1+ (CD1c) e TLR-7 em células dendríticas mielóides de indivíduos obesos (208). A redução de citocinas pró-inflamatórias

apresenta dados consistentes, demonstrando que o treinamento físico em longo prazo reduz os níveis circulantes de leptina e TNF- α sem a necessidade de reduções no tecido adiposo (209,210). O treinamento físico também apresenta grande impacto sobre o perfil de células progenitoras circulantes de indivíduos obesos, reduzindo o seu fenótipo pró-inflamatório e contribuindo para a resolução da inflamação tecidual (211).

Em resumo, altos níveis de capacidade cardiorrespiratória exercem efeitos antagônicos ao impacto da obesidade sobre o sistema imunológico. Indivíduos obesos metabolicamente saudáveis, caracterizados por um perfil lipídico/glicêmico com valores dentro da faixa de normalidade, apresentam menores níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias do que eutróficos e obesos metabolicamente não saudáveis (212). Neste sentido, o nível de capacidade cardiorrespiratória é considerado um dos principais fatores para o fenótipo “metabólico saudável” em obesos (213). No entanto, o possível impacto do treinamento físico e do aumento da capacidade cardiorrespiratória sobre a imunidade celular em indivíduos obesos permanece pouco elucidado.

REFERÊNCIAS

1. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, et al. Obesity. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:17034.
2. Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med.* 2017;376(3):254–66.
3. GBD 2015 Obesity Collaborators et al. Effects H. Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med.* 2017;377(1):13–27.
4. Tchernof A, Despres J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev.* 2013;93(1):359–404.
5. Devêvre EF, Renovato-Martins M, Clément K, Sautès-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. *J Immunol.* 2015;194(8):3917-23.
6. Ip BC, Hogan AE, Nikolajczyk BS. Lymphocyte roles in metabolic dysfunction: Of men and mice. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26(2):91–100.
7. Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberle C, Herzberg S, et al. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity.* 2013; 21(3):461-8.
8. Zhong J, Rao X, Braunstein Z, Taylor A, Narula V, Hazey J, et al. T-cell costimulation protects obesity-induced adipose inflammation and insulin resistance. *Diabetes.* 2014;63(4):1289–302.
9. Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R. Aging, obesity, and inflammatory age-related diseases. *Front Immunol.* 2017;8(DEC):1–10.
10. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation.* 2004;110(12):1564–71.
11. Van Dijk SJ, Molloy PL, Varinli H, Morrison JL, Muhlhausler BS, Buckley M, et al. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes.* 2015;39(1):85–97.
12. Zhang Z, Song L, Maurer K, Bagashev A, Sullivan KE. Monocyte polarization: The relationship of genome-wide changes in H4 acetylation with polarization. *Genes Immun.* 2011; 12(6):445-56
13. Booth FW, Roberts CK, Thyfault JP, Rueggsegger GN, Toedebusch RG. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary Insight and Pathophysiological Mechanisms. *Physiol Rev.* 2017; 97(4):1351-1402.
14. Pedersen BK. The Physiology of Optimizing Health with a Focus on Exercise as

- Medicine. *Annu Rev Physiol.* 2019;1–21.
15. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(8):1521-9.
 16. Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(7):1839–48.
 17. Rivera-Brown AM, Frontera WR. Principles of exercise physiology: Responses to acute exercise and long-term adaptations to training. *PM R.* 2012; 4(11):797-804.
 18. PAPE K, RYTTERGAARD L, ROTEVATN TA, NIELSEN BJ, TORP-PEDERSEN C, OVERGAARD C, et al. Leisure-Time Physical Activity and the Risk of Suspected Bacterial Infections. *Med Sci Sport Exerc.* 2016; 48(9):1737-44.
 19. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology.* 2011; 11(9):607-15
 20. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Elsevier Inc.; 2015; 135:355-80.
 21. Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, Van Leeuwen F, et al. The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 2004; 18(11):1263-71.
 22. Perry C, Pick M, Bdolach N, Hazan-Halevi I, Kay S, Berr I, et al. Endurance Exercise Diverts the Balance between Th17 Cells and Regulatory T Cells. *PLoS One.* 2013;8(10):1–8.
 23. Brown FF, Bigley AB, Sherry C, Neal CM, Witard OC, Simpson RJ, et al. Training status and sex influence on senescent T-lymphocyte redistribution in response to acute maximal exercise. *Brain Behav Immun.* 2014;39:152–9.
 24. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J Appl Physiol.* 2007;103(2):700–9.
 25. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017; 542(7640):177-185.
 26. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: Key players in immunometabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2012;

- 23(8):407-15.
27. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7(4):1–16.
 28. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007; 56(4):901-11.
 29. Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 2005; 46(11):2347-55.
 30. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009; 15(8):914-20.
 31. Han SJ, Glatman Zaretsky A, Andrade-Oliveira V, Collins N, Dzutsev A, Shaik J, et al. White Adipose Tissue Is a Reservoir for Memory T Cells and Promotes Protective Memory Responses to Infection. *Immunity*. 2017; 47(6):1154-1168.
 32. McLaughlin T, Liu LF, Lamendola C, Shen L, Morton J, Rivas H, et al. T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014; 34(12):2637-43.
 33. McLaughlin T, Ackerman SE, Shen L, Engleman E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017; 127(1):5-13.
 34. Gerriets VA, Danzaki K, Kishton RJ, Eisner W, Nichols AG, Saucillo DC, et al. Leptin directly promotes T-cell glycolytic metabolism to drive effector T-cell differentiation in a mouse model of autoimmunity. *Eur J Immunol*. 2016; 46(8):1970-83.
 35. De Rosa V, Procaccini C, Calì G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, et al. A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell Proliferation. *Immunity*. 2007; 26(2):241-55.
 36. Mraz M, Haluzik M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. *Journal of Endocrinology*. 2014; 222(3):R113-27.
 37. Johnson AR, Justin Milner J, Makowski L. The inflammation highway: Metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012; 249(1):218-38.
 38. Lumeng CN, DeYoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007;

- 56(1):16-23.
39. Kullo IJ, Hensrud DD, Allison TG. Comparison of numbers of circulating blood monocytes in men grouped by body mass index (<25, 25 to <30, ≥30). *American Journal of Cardiology*. 2002; 89(12):1441-3.
 40. Viardot A, Heilbronn LK, Samocha-Bonet D, Mackay F, Campbell L V., Samaras K. Obesity is associated with activated and insulin resistant immune cells. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012; 28(5):447-54.
 41. De Loera-Rodriguez CO, Delgado-Rizo V, Alvarado-Navarro A, Agraz-Cibrian JM, Segura-Ortega JE, Fafutis-Morris M. Over-expression of TLR4-CD14, pro-inflammatory cytokines, metabolic markers and NEFAs in obese non-diabetic Mexicans. *J Inflamm (United Kingdom)*. 2014; 11(1):39.
 42. Ahmad R, Al-Mass A, Atizado V, Al-Hubail A, Al-Ghimlas F, Al-Arouj M, et al. Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: Its significance for obesity-induced inflammation. *J Inflamm (United Kingdom)*. 2012;9(1):48.
 43. Pekkala S, Munukka E, Kong L, Pöllänen E, Autio R, Roos C, et al. Toll-like receptor 5 in obesity: The role of gut microbiota and adipose tissue inflammation. *Obesity*. 2015; 23(3):581-90.
 44. Scholtes VPW, Versteeg D, de Vries JPPM, Hoefer IE, Schoneveld AH, Stella PR, et al. Toll-like receptor 2 and 4 stimulation elicits an enhanced inflammatory response in human obese patients with atherosclerosis. *Clin Sci*. 2011; 121(5):205-14.
 45. Jaedicke KM, Roythorne A, Padget K, Todryk S, Preshaw PM, Taylor JJ. Leptin up-regulates TLR2 in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2013; 93(4):561-71.
 46. Satoh N, Shimatsu A, Himeno A, Sasaki Y, Yamakage H, Yamada K, et al. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: Effect of pioglitazone. *Diabetes Care*. 2010;33(1):2010.
 47. Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeire M, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2012; 9(3):189-95.
 48. Mærkedahl RB, Frøkiær H, Stenbæk MG, Nielsen CB, Lind M V., Lundtoft C, et al. *In Vivo* and *Ex Vivo* Inflammatory Markers of Common Metabolic Phenotypes in Humans. *Metab Syndr Relat Disord*. 2018; 16(1):29-39.
 49. Van de Veerdonk FL, Netea MG. Diversity: A Hallmark of Monocyte Society. *Immunity*. 2010;33(3):289-91.

50. Rogacev KS, Ulrich C, Blömer L, Hornof F, Oster K, Ziegelin M, et al. Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J.* 2010;31(3):369-76.
51. Cottam DR, Schaefer PA, Shaftan GW, Velcu L, Angus LDG. Effect of surgically-induced weight loss on leukocyte indicators of chronic inflammation in morbid obesity. *Obes Surg.* 2002; 12(3):335-42.
52. Leite F, Leite Â, Santos A, Lima M, Barbosa J, Cosentino M, et al. Predictors of Subclinical Inflammatory Obesity: Plasma Levels of Leptin, Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol and CD14 Expression of CD16⁺ Monocytes. *Obes Facts.* 2017; 10(4):308-322.
53. Krinninger P, Ensenauer R, Ehlers K, Rauh K, Stoll J, Krauss-Etschmann S, et al. Peripheral monocytes of obese women display increased chemokine receptor expression and migration capacity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):2500-9.
54. Suganami T, Ogawa Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *J Leukoc Biol.* 2010;88(1):33–9.
55. Van Der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4⁺T cells with skewing toward a Treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes.* 2012;61(2):401–8.
56. Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, et al. Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc.* 1999; 99(3):294-9.
57. Hanusch-Enserer U, Cauza E, Spak M, Dunky A, Rosen HR, Wolf H, et al. Acute-phase response and immunological markers in morbid obese patients and patients following adjustable gastric banding. *Int J Obes.* 2003; 27(3):355-61.
58. O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, et al. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes Surg.* 2005;15(10):1463–8.
59. Yang H, Youm Y-H, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol.* 2010; 185(3):1836-45.
60. Ip B, Cilfone NA, Belkina AC, Defuria J, Jagannathan-Bogdan M, Zhu M, et al. Th17 cytokines differentiate obesity from obesity-associated type 2 diabetes and promote

- TNF α production. *Obesity*. 2016; 24(1):102-12.
61. O'Rourke RW, Kay T, Lyle EA, Traxler SA, Deveney CW, Jobe BA, et al. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(1):39–46.
 62. Švec P, Vásárhelyi B, Pászthy B, Körner A, Kovács L, Tulassay T, et al. Do regulatory T cells contribute to Th1 skewness in obesity? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007; 115(7):439-43.
 63. Matarese G, Procaccini C, De Rosa V, Horvath TL, La Cava A. Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. *Trends in Molecular Medicine*. 2010; 16(6):247-56.
 64. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009; 15(8):930-9.
 65. Wang Z, Aguilar EG, Luna JJ, Dunai C, Khuat LT, Le CT, et al. Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nature Medicine*. 2018; 25(1):141-151.
 66. Richard C, Wadowski M, Goruk S, Cameron L, Sharma AM, Field CJ. Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2017;
 67. Mauro C, Smith J, Cucchi D, Coe D, Fu H, Bonacina F, et al. Obesity-Induced Metabolic Stress Leads to Biased Effector Memory CD4⁺T Cell Differentiation via PI3K p110 δ -Akt-Mediated Signals. *Cell Metab*. 2017;5(1):e000379.
 68. Neidich SD, Green WD, Rebeles J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Noah TL, et al. Increased risk of influenza among vaccinated adults who are obese. *Int J Obes*. 2017;
 69. Green WD, Beck MA. Obesity impairs the adaptive immune response to influenza virus. *Ann Am Thorac Soc*. 2017; 41(9):1324-1330.
 70. Parisi MM, Grun LK, Lavandoski P, Alves LB, Bristot IJ, Mattiello R, et al. Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. *Obesity*. 2017; 25(9):1523-1531.
 71. Paich HA, Sheridan PA, Handy J, Karlsson EA, Schultz-Cherry S, Hudgens MG, et al. Overweight and obese adult humans have a defective cellular immune response to pandemic H1N1 Influenza A virus. *Obesity*. 2013;21(11):2377–86.
 72. Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR, Chavakis T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia*. 2012; 55(10):2583-2592.
 73. Momesso Dos Santos CM, Sato FT, Cury-Boaventura MF, Guirado-Rodrigues SH,

- Caçula KG, Santos CCG, et al. Effect of regular circus physical exercises on lymphocytes in overweight children. *PLoS One*. 2015;10(3):1–16.
74. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2015; 16(5):544.
 75. Kolodin D, Van Panhuys N, Li C, Magnuson AM, Cipolletta D, Miller CM, et al. Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory t cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab*. 2015; 21(4):543-57.
 76. Fujii M, Inoguchi T, Batchuluun B, Sugiyama N, Kobayashi K, Sonoda N, et al. CTLA-4Ig immunotherapy of obesity-induced insulin resistance by manipulation of macrophage polarization in adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 438(1):103-9.
 77. Han JM, Wu D, Denroche HC, Yao Y, Verchere CB, Levings MK. IL-33 Reverses an Obesity-Induced Deficit in Visceral Adipose Tissue ST2+ T Regulatory Cells and Ameliorates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *J Immunol*. 2015; 194(10):4777-83.
 78. Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2008; 1783(5):673-94.
 79. Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol*. 1991;146(7):2235-44.
 80. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, Evans J, Eddaoudi A, Eaton S, et al. High Expression of the Ectonucleotidase CD39 on T Cells from the Inflamed Site Identifies Two Distinct Populations, One Regulatory and One Memory T Cell Population. *J Immunol*. 2010; 185(1):134-43.
 81. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine*. 2013; 19(6):355-67.
 82. Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International Journal of Oncology*. 2008; 32(3):527-35.
 83. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*. 2014; 509(7500):310-7.

84. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+CD25+T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant*. 2010; 10(11):2410-20.
85. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, et al. Human CD4+CD39+regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+exosomes or CD73+cells. *Clin Exp Immunol*. 2014; 177(2):531-43.
86. Schuler PJ, Schilling B, Harasymczuk M, Hoffmann TK, Johnson J, Lang S, et al. Phenotypic and functional characteristics of CD4+CD39+FOXP3+and CD4+CD39+FOXP3negT-cell subsets in cancer patients. *Eur J Immunol*. 2012; 42(7):1876-85.
87. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204(6):1257-65.
88. McRae JL, Chia JS, Pommey SA, Dwyer KM. Evaluation of CD4⁺ CD25^{+/-} CD39⁺ T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection. *Nephrology*. 2017;22(7):505–12.
89. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods*. 2009;346(1–2):55–63.
90. Sundstrom P, Stenstad H, Langenes V, Ahlmanner F, Theander L, Ndah TG, et al. Regulatory T Cells from Colon Cancer Patients Inhibit Effector T-cell Migration through an Adenosine-Dependent Mechanism. *Cancer Immunol Res*. 2016; 4(3):183-93.
91. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends in Immunology*. 2016; 37(7):427-439.
92. Ohta A, Kini R, Ohta A, Subramanian M, Madasu M, Sitkovsky M. The development and immunosuppressive functions of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol*. 2012;3(6):1–12.
93. Pandolfi J, Ferraro A, Lerner M, Serrano JR, Dueck A, Fainboim L, et al. Purinergic signaling modulates human visceral adipose inflammatory responses: implications in metabolically unhealthy obesity. *J Leukoc Biol*. 2015; 97(5):941-949.
94. Pandolfi JB, Ferraro AA, Sananez I, Gancedo MC, Baz P, Billordo LA, et al. ATP-

- Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J Immunol.* 2016; 196(8):3287-96.
95. Núñez Ruiz A, Cortés-García JD, Cortez-Espinosa N, Herrera-Rojas PI, Ruíz-Rodríguez VM, Salgado-Bustamante M, et al. Diminished levels of regulatory T cell subsets (CD8+Foxp3, CD4+Foxp3 and CD4+CD39+Foxp3) but increased Foxp3 expression in adipose tissue from overweight subjects. *Nutrition.* 2016; 32(9):943-54.
 96. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110(4):1225-32.
 97. Whiteside TL, Jackson EK. Adenosine and prostaglandin E2 production by human inducible regulatory T cells in health and disease. *Front Immunol.* 2013; 25;4:212.
 98. Linden J, Cekic C. Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(9):2097-103.
 99. García-Hernández MH, Portales-Cervantes L, Cortez-Espinosa N, Vargas-Morales JM, Fritche Salazar JF, Rivera-López E, et al. Expression and function of P2X7 receptor and CD39/Entpd1 in patients with type 2 diabetes and their association with biochemical parameters. *Cell Immunol.* 2011;269(2):135–43.
 100. Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, Martínez-Leija E, Rodríguez-Rivera JG, Barajas-López C, González-Amaro R, et al. CD39 expression on Treg and Th17 cells is associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol.* 2015;
 101. Guzman-Flores JM, Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, Vargas-Morales JM, Cataño-Cañizalez YG, Rodríguez-Rivera JG, et al. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology.* 2015;
 102. Obata Y, Furusawa Y, Hase K. Epigenetic modifications of the immune system in health and disease. *Immunology and Cell Biology.* 2015; 76(9):622-30.
 103. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007; 447(7143):396-8.
 104. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell.* 2007; 128(4):693-705.
 105. Church MC, Fleming AB. A role for histone acetylation in regulating transcription elongation. *Transcription.* 2018; 9(4):225-232.
 106. Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: From gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2015; 16(4):258-64.

107. Raghuraman S, Donkin I, Versteyhe S, Barrès R, Simar D. The Emerging Role of Epigenetics in Inflammation and Immunometabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2016; 27(11):782-795.
108. Ogryzko V V., Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 1996; 87(5):953-9.
109. Suárez-Álvarez B, Raneros AB, Ortega F, López-Larrea C. Epigenetic modulation of the immune function: A potential target for tolerance. *Epigenetics*. 2013; 8(7):694-702
110. Garrett S, Dietzmann-Maurer K, Song L, Sullivan KE. Polarization of Primary Human Monocytes by IFN- Induces Chromatin Changes and Recruits RNA Pol II to the TNF- Promoter. *J Immunol*. 2008; 180(8):5257-66.
111. Moodie FM. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J*. 2004; 18(15):1897-9.
112. Yang S-R. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *AJP Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291(1):L46-57.
113. Wang X, Zhu H, Snieder H, Su S, Munn D, Harshfield G, et al. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med*. 2010; 21;8:87.
114. Hermsdorff HH, Mansego ML, Campión J, Milagro FI, Zulet MA, Martínez JA. TNF- α promoter methylation in peripheral white blood cells: Relationship with circulating TNF α , truncal fat and n-6 PUFA intake in young women. *Cytokine*. 2013; 64(1):265-71.
115. Costantino S, Mohammed SA, Ambrosini S, Paneni F. Epigenetic processing in cardiometabolic disease. *Atherosclerosis*. 2018; S0021-9150(18)31402-3.
116. Arner P, Sahlqvist AS, Sinha I, Xu H, Yao X, Waterworth D, et al. The epigenetic signature of systemic insulin resistance in obese women. *Diabetologia*. 2016; 59(12):2728.
117. Yang X, Wang X, Liu D, Yu L, Xue B, Shi H. Epigenetic Regulation of Macrophage Polarization by DNA Methyltransferase 3b. *Mol Endocrinol*. 2014; 28(4):565-74.
118. Mikula M, Majewska A, Ledwon JK, Dzwonek A, Ostrowski J. Obesity increases histone H3 lysine 9 and 18 acetylation at Tnfa and Ccl2 genes in mouse liver. *Int J Mol Med*. 2014; 34(6):1647-54.
119. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al.

- Proteomics Analysis of Human Obesity Reveals the Epigenetic Factor HDAC4 as a Potential Target for Obesity. *PLoS One*. 2013; 8(9):e75342.
120. Hsu P-S, Wu C-S, Chang J-F, Lin W-N. Leptin Promotes cPLA2 Gene Expression through Activation of the MAPK/NF- κ B/p300 Cascade. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(11):27640-58.
 121. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Jeffrey MG, Woods A, Bishop NC, et al. Part one : Immune function and exercise. *EIR 17 2011 position statement*. 2011; 17:6-63.
 122. Graff RM, Kunz HE, Agha NH, Baker FL, Laughlin M, Bigley AB, et al. β 2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8⁺ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018; 74:143-153.
 123. Ball D. Metabolic and endocrine response to exercise: Sympathoadrenal integration with skeletal muscle. *Journal of Endocrinology*. 2015; 224(2):R79-95.
 124. Peake JM, Tan SJ, Markworth JF, Broadbent JA, Skinner TL, Cameron-Smith D. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. *AJP Endocrinol Metab*. 2014;307(7):E539–52.
 125. Hong S, Johnson T a, Farag NH, Guy HJ, Matthews SC, Ziegler MG, et al. Attenuation of T-lymphocyte demargination and adhesion molecule expression in response to moderate exercise in physically fit individuals. *J Appl Physiol*. 2005;98(3):1057–63.
 126. Agha NH, Baker FL, Kunz HE, Graff R, Azadan R, Dolan C, et al. Vigorous exercise mobilizes CD34⁺ hematopoietic stem cells to peripheral blood via the β 2-adrenergic receptor. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2017; 68:66-75.
 127. Rooney B V., Bigley AB, LaVoy EC, Laughlin M, Pedlar C, Simpson RJ. Lymphocytes and monocytes egress peripheral blood within minutes after cessation of steady state exercise: A detailed temporal analysis of leukocyte extravasation. *Physiol Behav*. 2018; 194:260-267.
 128. Gleeson M, Bishop NC. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant*. 2005;10(4):43-8.
 129. Walsh NP, Walsh NP. Recommendations to maintain immune health in athletes Recommendations to maintain immune health in athletes. *Eur J Sport Sci*. 2018;0(0):1–12.
 130. Minuzzi LG, Rama L, Chupel MU, Rosado F, Dos Santos JV, Simpson R, et al. Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2018; 24:72-84.

131. Simpson RJ, Bigley AB, Agha N, Hanley PJ, Bollard CM. Mobilizing immune cells with exercise for cancer immunotherapy. *Exerc Sport Sci Rev*. 2017;45(3):163–72.
132. Shantsila E, Tapp LD, Wrigley BJ, Montoro-Garcia S, Ghattas A, Jaipersad A, et al. The effects of exercise and diurnal variation on monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(8):832–9.
133. Gustafson MP, DiCostanzo AC, Wheatley CM, Kim C-H, Bornschlegl S, Gastineau DA, et al. A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. *J Immunother Cancer*. 2017;
134. Okutsu M, Ishii K, Niu K, Nagatomi R. Cortisol is not the primary mediator for augmented CXCR4 expression on natural killer cells after acute exercise. *J Appl Physiol*. 2014; 18;5:30.
135. Warren KJ, Olson MM, Thompson NJ, Cahill ML, Wyatt TA, Yoon KJ, et al. Exercise improves host response to influenza viral infection in obese and non-obese mice through different mechanisms. *PLoS One*. 2015; 10(6):e0129713.
136. Neubauer O, Sabapathy S, Ashton KJ, Desbrow B, Peake JM, Lazarus R, et al. Time course-dependent changes in the transcriptome of human skeletal muscle during recovery from endurance exercise: from inflammation to adaptive remodeling. *J Appl Physiol*. 2014; 116(3):274-87.
137. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HWL. Selective mobilization of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by exercise. *Am J Physiol Physiol*. 2000; 279(3):C578-86.
138. Durrer C, Francois M, Neudorf H, Little JP. Acute high-intensity interval exercise reduces human monocyte Toll-like receptor 2 expression in type 2 diabetes. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(4):R529–38.
139. Slusher AL, Zúñiga TM, Acevedo EO. Maximal Exercise Alters the Inflammatory Phenotype and Response of Mononuclear Cells. *Med Sci Sports Exerc*. 2018; 50(4):675-683.
140. Wonner R, Wallner S, Orsó E, Schmitz G. Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2018; 94(4):596-605.
141. de Matos MA, Duarte TC, Ottone V de O, Sampaio PF d. M, Costa KB, de Oliveira MFA, et al. The effect of insulin resistance and exercise on the percentage of CD16⁺ monocyte subset in obese individuals. *Cell Biochem Funct*. 2016; 34(4):209-16

142. Simpson RJ, McFarlin BK, McSporran C, Spielmann G, Hartaigh B ó, Guy K. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain Behav Immun.* 2009; 23(2):232-9.
143. Lancaster GI, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, et al. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol.* 2005; 563(Pt 3):945-55.
144. Gleeson M, McFarlin B, Flynn M. Exercise and toll-like receptors. *Exercise Immunology Review.* 2006; 12:34-53.
145. Da Silva Rossato J, Krause M, Fernandes AJM, Fernandes JR, Seibt IL, Rech A, et al. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise. *J Physiol Biochem.* 2014;70(2):363–74.
146. Hong S, Mills PJ. Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain Behav Immun.* 2008; 22(4):590-9.
147. Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 1999; 515 (Pt 1):287-91.
148. Nielsen HG, Øktedalen O, Opstad P-K, Lyberg T. Plasma Cytokine Profiles in Long-Term Strenuous Exercise. *J Sports Med.* 2016; 2016:7186137.
149. Kruger K, Frost S, Most E, Volker K, Pallauf J, Mooren FC. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(5):R1518–27.
150. Krüger K, Lechtermann A, Fobker M, Völker K, Mooren FC. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. *Brain Behav Immun.* 2008; 22(3):324-38.
151. Campbell JP, Turner JE. Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: Redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Frontiers in Immunology.* 2018; 9:648.
152. Spielmann G, Bollard CM, Kunz H, Hanley PJ, Simpson RJ. A single exercise bout enhances the manufacture of viral-specific T-cells from healthy donors: Implications for allogeneic adoptive transfer immunotherapy. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–13.
153. KrÄger K, Alack K, Ringseis R, Mink L, Pfeifer E, Schinle M, et al. Apoptosis of T-Cell Subsets after Acute High-Intensity Interval Exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(10):2021–9.
154. Navalta JW, Lyons S, Prestes J, Arnett SW, Schafer M, Sobrero GL. Exercise intensity

- and lymphocyte subset apoptosis. *Int J Sports Med.* 2013; 34(3):268-73.
155. Simpson RJ, Florida-James GD, Cosgrove C, Whyte GP, Macrae S, Pircher H, et al. High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. *J Appl Physiol.* 2007; 103(1):396-401.
 156. Simpson RJ. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: Can exercise “make space”? *Exerc Sport Sci Rev.* 2011; 39(1):23-33.
 157. Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev.* 2012;18(II):97–113.
 158. Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc Immunol Rev.* 2012; 18:98-114.
 159. Xiang L, Del Ben KS, Rehm KE, Marshall GD. Effects of acute stress-induced immunomodulation on Th1/Th2 cytokine and catecholamine receptor expression in human peripheral blood cells. *Neuropsychobiology.* 2011; 65(1):12-9.
 160. Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Marshall-Gradisnik SM. T Helper Cell Cytokine Profiles After Endurance Exercise. *J Interf Cytokine Res.* 2014;34(9):699–706.
 161. Siedlik JA, Benedict SH, Landes EJ, Weir JP, Vardiman JP, Gallagher PM. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain Behav Immun.* 2016;56:343–51.
 162. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sport.* 2012; 22(5):643-52.
 163. Dugger KJ, Chrisman T, Sayner SL, Chastain P, Watson K, Estes R. Beta-2 adrenergic receptors increase TREG cell suppression in an OVA-induced allergic asthma mouse model when mice are moderate aerobically exercised. *BMC Immunol.* 2018;19(1):1–13.
 164. Uchiyama M, Jin X, Yin E, Shimokawa T, Niimi M. Treadmill exercise induces murine cardiac allograft survival and generates regulatory T cell. *Transpl Int.* 2015;28(3):352–62.
 165. Wilson LD, Zaldivar FP, Schwindt CD, Wang-Rodriguez J, Cooper DM. Circulating T-regulatory cells, exercise and the elite adolescent swimmer. *Pediatr Exerc Sci.* 2009;21(3):305–17.
 166. KrÄ¼ger K, Alack K, Ringseis R, Mink L, Pfeifer E, Schinle M, et al. Apoptosis of T-

- Cell Subsets after Acute High-Intensity Interval Exercise. Vol. 48, Medicine and Science in Sports and Exercise. 2016. 2021-2029 p.
167. Minuzzi LG, Rama L, Bishop NC, Rosado F, Martinho A, Paiva A, et al. Lifelong training improves anti-inflammatory environment and maintains the number of regulatory T cells in masters athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2017;117(6):1131–40.
 168. Clifford T, Wood MJ, Stocks P, Howatson G, Stevenson EJ, Hilkens CMU. T-regulatory cells exhibit a biphasic response to prolonged endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2017;117(8):1727–37.
 169. Allen J, Sun Y, Woods JA. Exercise and the Regulation of Inflammatory Responses. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 2015. 337-354
 170. Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol.* 1998; 508 (Pt 3):949-53.
 171. Ringseis R, Eder K, Mooren FC, Krüger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:58–68.
 172. Benatti FB, Pedersen BK. Exercise as an anti-inflammatory therapy for rheumatic diseases - Myokine regulation. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(2):86–97.
 173. Pal M, Febbraio MA, Whitham M. From cytokine to myokine: The emerging role of interleukin-6 in metabolic regulation. *Immunology and Cell Biology.* 2014; 92(4):331-9.
 174. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012;8(8):457–65.
 175. Keller P, Keller C, Carey AL, Jauffred S, Fischer CP, Steensberg A, et al. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: Autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(2):550–4.
 176. Steensberg a, Toft a D, Bruunsgaard H, Sandmand M, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK. Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *J Appl Physiol.* 2001;91(4):1708–12.
 177. Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. 2015;1–72.
 178. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:27-55.
 179. Teh PP, Vasanthakumar A, Kallies A. Development and Function of Effector Regulatory T Cells. 1st ed. Vol. 136, *Progress in Molecular Biology and Translational*

- Science. Elsevier Inc.; 2015. 155-174
180. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009; 183(11):7602-10.
 181. Dorneles GP, Haddad DO, Fagundes VO, Vargas BK, Kloecker A, Romão PRT, et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine.* 2016; 77:1-9.
 182. Sharif K, Watad A, Bragazzi NL, Lichtbroun M, Amital H, Shoenfeld Y. Physical activity and autoimmune diseases: Get moving and manage the disease. *Autoimmun Rev.* 2018;17(1):53–72.
 183. Ulven SM, Foss SS, Skjolsvik AM, Stadheim HK, Myhrstad MC, Raael E, et al. An acute bout of exercise modulate the inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells in healthy young men. *Arch Physiol Biochem.* 2015;121(2):41–9.
 184. Xiang L, Rehm KE, Marshall GD. Effects of strenuous exercise on Th1/Th2 gene expression from human peripheral blood mononuclear cells of marathon participants. *Mol Immunol.* 2014;60(2):129–34.
 185. Karsten K, Frank-Christoph M, Christian P. The immunomodulatory effects of physical activity. *Curr Pharm Des.* 2016;3730–48.
 186. Terra R, Alves PJF, Salerno VP, Dutra PML, Janeiro R De, Janeiro R De. Exercise Improves the Th1 Response by Modulating Cytokine and NO Production in BALB / c Mice. 2012;661–6.
 187. Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity - and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *Journal of Physiology.* 2009; 587(Pt 23):5559-68.
 188. Nielsen ST, Harder-Lauridsen NM, Benatti FB, Wedell-Neergaard A-S, Lyngbæk MP, Møller K, et al. The effect of 8 days of strict bed rest on the incretin effect in healthy volunteers. *J Appl Physiol.* 2016; 120(6):608-14.
 189. Wedell-Neergaard AS, Eriksen L, Grønbæk M, Pedersen BK, Krogh-Madsen R, Tolstrup J. Low fitness is associated with abdominal adiposity and low-grade inflammation independent of BMI. *PLoS One.* 2018; 13(1):e0190645.
 190. Bruun JM. Diet and exercise reduce low-grade inflammation and macrophage infiltration in adipose tissue but not in skeletal muscle in severely obese subjects. *AJP Endocrinol Metab.* 2006; 290(5):E961-7.
 191. Edwards MK, Loprinzi PD. Systemic inflammation as a function of the individual and

- combined associations of sedentary behaviour, physical activity and cardiorespiratory fitness. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2018; 38(1):93-99.
192. Park E, Meininger JC, Kang DH, Gabriel KP, Padhye NS. Association of cardiorespiratory fitness and adiposity with inflammatory biomarkers in young adults. *Am J Hum Biol*. 2017; 29(3).
 193. Kasapis C, Thompson PD. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: A systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1563–9.
 194. Horn PL, West NP, Pyne DB, Koerbin G, Lehtinen SJ, Fricker PA, et al. Routine exercise alters measures of immunity and the acute phase reaction. *Eur J Appl Physiol*. 2015; 115(2):407-15.
 195. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: A scientific statement from the American heart association. *Circulation*. 2013; 128(8):873-934.
 196. Balady GJ, Arena R, Sietsema K, Myers J, Coke L, Fletcher GF, et al. Clinician ' s Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults A Scientific Statement From the American Heart Association. 2010;191–225.
 197. Herdy AH, Ritt LEF, Stein R, Araújo CGS de, Milani M, Meneghelo RS, et al. Cardiopulmonary Exercise Test: Fundamentals, Applicability and Interpretation. *Arq Bras Cardiol*. 2016;467–81.
 198. Lavie CJ, De Schutter A, Milani R V. Healthy obese versus unhealthy lean: The obesity paradox. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(1):55–62.
 199. Duggal NA, Pollock RD, Lazarus NR, Harridge S, Lord JM. Major features of immunesenescence, including reduced thymic output, are ameliorated by high levels of physical activity in adulthood. *Aging Cell*. 2018; 17(2).
 200. Weinhold M, Shimabukuro-Vornhagen A, Franke A, Theurich S, Wahl P, Hallek M, et al. Physical exercise modulates the homeostasis of human regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1607–1610.e3.
 201. McFarlin BK, Flynn MG, Campbell WW, Stewart LK, Timmerman KL. TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(11):1876–83.
 202. Flynn MG, McFarlin BK, Phillips MD, Stewart LK, Timmerman KL. Toll-like receptor 4 and CD14 mRNA expression are lower in resistive exercise-trained elderly women. *J Appl Physiol*. 2003; 95(5):1833-42.

203. Hong S, Dimitrov S, Pruitt C, Shaikh F, Beg N. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: Role of beta adrenergic receptors. *Brain Behav Immun*. 2014; 39:113-20.
204. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol*. 2008; 84(5):1271-8.
205. Markofski MM, Flynn MG, Carrillo AE, Armstrong CLH, Campbell WW, Sedlock DA. Resistance exercise training-induced decrease in circulating inflammatory CD14+CD16+ monocyte percentage without weight loss in older adults. *Eur J Appl Physiol*. 2014; 114(8):1737-48.
206. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Souza HA, Caperuto EC, Carnevali LC, et al. Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects. *Lipids Health Dis*. 2010; 9:82.
207. Barry JC, Simtchouk S, Durrer C, Jung ME, Little JP. Short-term exercise training alters leukocyte chemokine receptors in obese adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2017;49(8):1631–40.
208. Nickel T, Hanssen H, Emslander I, Drexel V, Hertel G, Schmidt-Trucksäss A, et al. Immunomodulatory effects of aerobic training in obesity. *Mediators Inflamm*. 2011; 2011:308965.
209. You T, Arsenis NC, Disanzo BL, Lamonte MJ. Effects of exercise training on chronic inflammation in obesity: Current evidence and potential mechanisms. *Sports Medicine*. 2013; 2011:308965.
210. Teixeira AA de S, Lira FS, Pimentel GD, Oliveira de Souza C, Batatinha H, Biondo LA, et al. Aerobic Exercise Modulates the Free Fatty Acids and Inflammatory Response During Obesity and Cancer Cachexia. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2016; 26(3):187-98.
211. Niemi GM, Allen JM, Mailing LJ, Khan NA, Holscher HD, Woods JA, et al. Effects of endurance exercise training on inflammatory circulating progenitor cell content in lean and obese adults. *J Physiol*. 2018;0:1–12.
212. Phillips CM, Perry IJ. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults? *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(10):E1610-9.

213. Ortega FB, Cadenas-Sanchez C, Migueles JH, Labayen I, Ruiz JR, Sui X, et al. Role of Physical Activity and Fitness in the Characterization and Prognosis of the Metabolically Healthy Obesity Phenotype: A Systematic Review and Meta-analysis. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2018; 61(2):190-205.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto agudo e crônico de diferentes tipos de exercício físico na inflamação subclínica, subtipos de monócitos, subpopulações de linfócitos T e aspectos epigenéticos em células mononucleares do sangue periférico de homens eutróficos e obesos.

3.2 Objetivos específicos

Artigo 1

- Avaliar o nível de acetilação de Histona H4 e a atividade da enzima HDAC2 em células mononucleares periféricas, estimuladas com 10 ng/mL de LPS, de homens eutróficos e com obesidade submetidos a uma sessão de exercício físico exaustivo.
- Avaliar o nível sistêmico e a produção de citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α por células mononucleares periféricas estimuladas com 10 ng/mL de LPS de homens eutróficos e com obesidade submetidos a uma sessão de exercício físico exaustivo.
- Verificar o impacto de uma sessão de exercício exaustivo sobre o perfil de monócitos de homens eutróficos e com obesidade.
- Correlacionar o percentual de modificações nos níveis de acetilação da histona H4 com parâmetros de composição corporal dos indivíduos participantes.
- Correlacionar o percentual de modificações nos níveis de acetilação da histona H4 com os percentuais de modificações em parâmetros inflamatórios.

Para responder a estes objetivos, células mononucleares do sangue periférico de indivíduos eutróficos e com obesidade grau 1 foram coletadas antes e após uma única sessão de exercício exaustivo em estepe. Os subtipos de monócitos foram avaliados através de citometria de fluxo utilizando os anticorpos monoclonais CD14 e CD16 (CD14+CD16- para monócitos clássicos; CD14+CD16+ para monócitos não clássicos). As células mononucleares foram estimuladas in vitro com 10 ng/mL de LPS em condições padrões durante 24 h. O estado de acetilação de histona H4 de células mononucleares foi avaliado através do balanço entre a acetilação da histona H4 e a atividade da enzima HDAC2, enquanto a produção das citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α foi avaliada por ELISA. Análises adicionais de parâmetros sistêmicos (hormônios e análise de dano oxidativo) também foram realizadas.

Artigo 2

- Avaliar o impacto de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade sobre a frequência de células T CD4+CD25+ e CD4+CD25- que expressam as ectonucleotidases CD39 e CD73 em indivíduos eutróficos saudáveis.
- Comparar o impacto da capacidade cardiorrespiratória sobre a modulação da frequência de células T CD4+ de memória efetora (CD4+CD25-CD39+) e células T reguladora de memória (CD4+CD25+CD39+) em resposta a uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade.
- Comparar o impacto da capacidade cardiorrespiratória sobre a modulação da frequência de células T CD4+CD25- e CD4+CD25+ que expressam CD73 em resposta a uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade.
- Correlacionar a capacidade cardiorrespiratória com a frequência de células T CD4+ de memória efetora (CD4+CD25-CD39+) e células T reguladora de memória (CD4+CD25+CD39+).

Para atingir estes objetivos, células mononucleares do sangue periférico de indivíduos eutróficos com alta e baixa capacidade cardiorrespiratória foram obtidas antes, imediatamente após e 1 h após uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade. A expressão de ectonucleotidases CD39 e CD73 em células T CD4+CD25- e CD4+CD25+ do sangue periférico foi avaliada através de citometria de fluxo.

Artigo 3

- Verificar o impacto da capacidade cardiorrespiratória sobre a frequência periférica de linfócitos T ativados, linfócitos T reguladores, linfócitos T de memória efetora e subtipos de monócitos em indivíduos eutróficos e obesos.
- Analisar o impacto da capacidade cardiorrespiratória sobre os níveis sistêmicos de citocinas pró- e anti-inflamatórias em indivíduos eutróficos e obesos.
- Verificar o perfil metabólico de indivíduos eutróficos e obesos com diferentes níveis de capacidade cardiorrespiratória.
- Analisar o impacto de uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade sobre a frequência periférica de linfócitos T reguladores, e a expressão de CD39 e CD73 em células T CD4+CD25+ de indivíduos obesos sedentários.

Para atingir os objetivos, 45 homens eutróficos e 45 homens obesos realizaram um teste cardiopulmonar máximo e foram alocados em grupos de acordo com o seu VO2Max e composição corporal. As frequências periféricas de células T CD4+ e CD8+ totais, células T ativadas (CD3+HLA-DR+, CD3+CCR5+ e CD4+CD25+), linfócitos T reguladores (CD4+CD25^{high}127^{low}), bem como da expressão de ectonucleotidases CD39 e CD73 em células T CD4+CD25- e CD4+CD25+ e ainda dos subtipos de monócitos (CD14+CD16- para monócitos clássicos; CD14+CD16+ para monócitos intermediários; CD14+CD16+ para monócitos não clássicos) foram determinadas por citometria de fluxo. Os níveis sistêmicos de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , leptina) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-33) foram avaliados através de ELISA. O perfil metabólico foi avaliado através das concentrações de triglicerídeos, colesterol total, HDL, LDL e glicemia em jejum.

4. CAPÍTULO II

4.1 Artigo Original – Acute strenuous exercise induces an imbalance on histone H4 acetylation/ histone deacetylase 2 and increases the proinflammatory profile of PBMC of obese individuals

Acute strenuous exercise induces an imbalance on histone H4 acetylation/ histone deacetylase 2 and increases the proinflammatory profile of PBMC of obese individuals

Gilson P Dorneles¹, Maria Carolina R Boeira², Lucas L Schipper², Ivy RV Silva², Viviane R Elsner², Pedro Dal Lago^{1,3}, Alessandra Peres^{1,2,3*}, Pedro R TRomão^{1*}

¹Graduate Program in Health Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

² Graduate Program in Bioscience and Rehabilitation, Research Center, Methodist University Center IPA, Porto Alegre, RS, 90420-060, Brazil.

³ Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

First Authorship: Gilson Pires Dorneles email: gilsonpd@ufcspa.edu.br

*Corresponding authors:

Pedro Roosevelt Torres Romão (pedror@ufcspa.edu.br) and Alessandra Peres (peres@ufcspa.edu.br), Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Sarmiento Leite, 245, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Publicado na revista Oxidative Medicine and Cellular Longevity

Fator de Impacto: 4.936

Research Article

Acute Strenuous Exercise Induces an Imbalance on Histone H4 Acetylation/Histone Deacetylase 2 and Increases the Proinflammatory Profile of PBMC of Obese Individuals

Gilson P. Dorneles,¹ Maria Carolina R. Boeira,² Lucas L. Schipper,² Ivy R. V. Silva,² Viviane R. Elsner,² Pedro Dal Lago,³ Alessandra Peres,^{1,2,3} and Pedro R. T. Romão¹

¹Graduate Program in Health Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

²Research Center, Graduate Program in Bioscience and Rehabilitation, Methodist University Center IPA, 90420-060 Porto Alegre, RS, Brazil

³Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Alessandra Peres; peres@ufcspa.edu.br and Pedro R. T. Romão; pedror@ufcspa.edu.br

Received 6 June 2017; Revised 7 August 2017; Accepted 10 September 2017; Published 19 October 2017

Academic Editor: Steven McAnulty

Copyright © 2017 Gilson P. Dorneles et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study evaluated the response of global histone H4 acetylation (H4ac), histone deacetylase 2 (HDAC2) activity, as well as the production of proinflammatory cytokines and monocyte phenotypes of lean and obese males after exercise. Ten lean and ten obese sedentary men were submitted to one session of strenuous exercise, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated *in vitro* with lipopolysaccharide (LPS). Global H4ac levels, HDAC2 activity in PBMC, and IL-6, IL-8, and TNF- α production were analyzed. Monocyte phenotype was determined in accordance with the expression of CD14 and CD16. At rest, obese individuals presented higher frequency of proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes. LPS induced a significant augment in global H4ac and in the production of IL-6, IL-8, and TNF- α mainly in obese individuals. After exercise, the increased production of IL-8 and TNF- α and peripheral frequency of CD14⁺CD16⁺ were observed in both groups. In addition, exercise also induced a significant hyperacetylation of histone H4 and decreased HDAC2 activity in both nonstimulated and LPS-stimulated PBMC of obese individuals. Our data indicate that the obesity impacts on H4ac levels and that strenuous exercise leads to an enhanced chronic low-grade inflammation profile in obesity via an imbalance on H4ac/HDAC2.

1. Introduction

Obesity is considered an epidemic disease in many developed and developing countries, where it has become a major public health problem [1]. In obese people, the chronic low-grade inflammation is linked to cardiometabolic diseases, such as diabetes and atherosclerosis, and risk of premature death [2, 3]. Early studies have described that this proinflammatory condition is associated with high expression of nuclear factor kappa-B (NF- κ B) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [4, 5]. In fact, obesity is associated with a proinflammatory profile of immune cells,

specially monocytes/macrophages and type 1 T helper (Th1) cells and an elevation in the adipose tissue expression and plasma concentrations of several inflammatory mediators including tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) [3, 4, 6].

Emerging evidences indicate that epigenetic events play a pivotal role in the interplay between genes and environmental factors that generate the inflammatory pathway in obesity [7, 8]. Consequently, the epigenetic regulation, in particular, posttranslation histone modifications have a pivotal role in inflammation and immune response [7]. Histone acetylation occurs by histone acetyltransferases (HATs). Conversely,

histone deacetylases (HDACs) remove the acetyl groups from the amino-terminal tail of acetylated histones, counteract the effects of HATs, and return histone to its basal state [9]. Moreover, the acetylation of histone H4 (H4ac) is especially important for chromatin structure, gene expression, cell polarization, and cytokine production [10, 11]. In this regard, it was demonstrated that the lipopolysaccharide- (LPS-) stimulated monocytes/macrophages M1 polarization and the expression of NF- κ B are dependent of global H4ac status [12–14]. In a genome-wide study, Zhang and coworkers [12] described that in M1 macrophages, the H4ac expression was significantly increased after stimulation with interferon- γ (IFN- γ), but little was modified by the IL-4 treatment. In addition, it was shown that the activation of NF- κ B and the release of TNF- α and IL-8 by cultured cells was widely dependent on H4ac, confirming that the acetylation levels and enhanced transcriptional activity are able to modulate the cytokine production during endotoxin stimulation [13, 15]. The H4ac status is controlled by a variety of HDAC isoform enzymes that reduces the transcription of inflammatory genes in monocytes [16]. Among a series of HDAC subtypes, it was shown that the transactivation of NF- κ B and TNF- α expression was downregulated through the interaction of p65 subunit of NF- κ B with HDAC1 and HDAC2 [17]. Moreover, Ito and coworkers [18] have described that the HDAC2 reduces the acetylation of histone H4 at lysines 8 and 12 and the production of IL-1 β . However, there is no data about the influence of obesity on H4ac status and HDAC2 activity.

Physical exercise is considered a subset of physical stress, like thermal and traumatic injury [19] that modulates the immune response, being a good experimental model for understanding the relationship between physical exercise and pathogenesis of noninfectious systemic diseases [20]. In fact, it is able to modify immune cell distribution, phenotype [20], and cytokine production [6, 21]. Indeed, Terra and coworkers [22] demonstrated that aerobic exercise enhanced the production of IL-12 and TNF- α when stimulated by LPS or infected with *Leishmania major* (an intracellular protozoan), compared with the nonexercised control group [22]. Therefore, physical exercise is able to modulate the immune response against infectious and noninfectious stimuli.

Some studies suggest that physical exercise acts as an epigenetic inductor in peripheral leukocytes [23, 24]. Until now, the studies have focused primarily on the impact of acute exercise on methylation changes in PBMCs [24, 25]. Therefore, there is a relative lack of data on the effects of exercise on histone modifications in immune cells of obese individuals. Recently, our group has demonstrated that acute high-intensity interval exercise was able to increase the global HDAC activity in PBMC of obese men [26]. In this sense, there is no data on the influence of H4ac and HDAC2 status in PBMC of obese individuals in response to TLR4 agonist under basal and exercised conditions. Here, we evaluate the effect of acute strenuous exercise on epigenetic markers in LPS-stimulated PBMC, the cytokine production, and in the peripheral frequency of monocyte phenotypes of lean and obese individuals.

2. Methods

2.1. Subjects. Twenty physically active men took part in this study: ten lean (BMI 18.6 to 24.9 kg/m²) and ten obese level 1 (BMI 30.0 to 34.9 kg/m²). All participants were apparently healthy and generally physically active, but none engaged in physical training (based on an International Physical Activity Questionnaire-IPAQ with a score less than 1500 MET (minute/week)—<https://www.ipaq.ki.se/downloads.htm>). Participants were healthy, none smokers, age ranging from 20 to 40 years, and free of illness and injury, and they were not engaged in physical training programs for a period of six months prior to experimental trials. Exclusion criteria included autoimmune, cardiac, endocrine or metabolic diseases, acute and chronic infections, and under current drugs or dietary supplements with recognized impact on the immune system. After inclusion in the study, subjects completed a medical questionnaire and the Physical Activity Readiness Questionnaire. The Ethics Committee of the UFCSPA approved this study (protocol number 1.973.432), and all experimental procedures were performed according to the Declaration of Helsinki. All participants were informed about the study and signed the informed consent.

2.2. Preliminary Measurements. One week before the experimental trial, all participants went to the laboratory to estimate their body composition and cardiorespiratory fitness. During the trials, the temperature and humidity of the room were continuously controlled (18 to 24°C and humidity 50–70%). Prior to the analysis, participants were asked to fast for 12 h and to have a good night sleep of at least 8 h. The participants were strongly encouraged to avoid moderate to high energy expenditure activities 24 h before the cardiorespiratory test and the exercise trial. On this day, a fasting blood sample (4 mL) was collected into tubes without anticoagulant (BD, EUA), centrifuged (1000g), aliquoted, and frozen at –20°C to determine the metabolic profile (glucose and lipid profile).

A qualified professional performed all anthropometric evaluations, and all tests were performed three times and the average was used for analysis. Body mass (kg) and height (meters) were determined by a semi-analytical scale (Welmy, Santa Barbara D'Oeste, Brazil), with capacity for 200 kg and a stadiometer attached (Welmy, Santa Barbara D'Oeste, Brazil) with an accuracy of 0.1 kg and 0.005 cm, respectively. Waist (WC, cm), abdomen (AC, cm), and hip (HC, cm) circumferences were measured through an inelastic measuring tape. BMI (kg/m²) was defined as body mass (kg) divided by the square of height (m²).

An incremental exercise test was conducted to determine VO₂ max using the breath-by-breath method and an open-circuit spirometry system (Quark CPET, COSMED, Rome, Italy). The progressive exercise test was performed on a treadmill and lasted for 8 to 12 min according to the recommendations of the American College of Sports Medicine (ACSM) [27]. The test ended if the participant reached volitional exhaustion, respiratory exchange ratio (RER) $\geq$ 1.15, or HR $\geq$ 95% of age-predicted maximum. VO₂ max was

determined when a plateau in the VO₂ occurred when it is further increased by exercise intensity.

2.3. Experimental Design and Procedures. After the preliminary visit, participants arrived at the laboratory at 8:00 to perform a single session of strenuous exercise. One hour before the exercise, participants consumed a normal breakfast (average 300 kcal: orange juice, cake, banana, and yogurt). A 24 h diet recall interview was performed by a nutritionist to record the amount of food and beverage consumed 24 h before the exercise trial. Energy intake was determined using a dietary analysis software (DietWin, Porto Alegre, Brazil).

After that, they remained at rest during 5 minutes and a resting (rest) blood sample was taken from the antecubital vein using sterile vacutainer tubes (15 mL into K₃EDTA tube) (Becton Dickinson (BD) Juiz de Fora, MG, Brazil). Then, they were required to perform a strenuous exercise consisting of stepping up and down from a step. The step height was individually adjusted to the height of each subject's femoral condyles. The stepping rhythm was paced acoustically at 60 beats per minute with same periods (1 s) for stepping up and down, respectively. When the participants were not able to maintain the required stepping rhythm, a 30 s recovery period was given to them. Following, they were required to recommence another set of the stepping cadence until fatigued and subsequently given another 30 s recovery period. This sequence was continued until complete exhaustion when even after a 30 s recovery the subject was not able to continue. Further venous blood samples (15 mL) were taken immediately after exercise. This protocol is based on the study of Saxton and coworkers [28]. For each subject, the total number of sets, stepping repetitions in each set, heart rate response, and perceived exertion, was recorded.

2.4. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Isolation and Stimulation with TLR4 Agonist. PBMC of lean and obese individuals was isolated from peripheral blood using Histopaque 1077 (Sigma, USA) as described by Bicalho et al. [29]. Plasma was collected and frozen at -20°C for biomarkers analysis as described below. PBMC viability was determined by trypan blue exclusion and the viability was always >95%. Then, the cells were washed and suspended in Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (RPMI-1640, Sigma, USA) supplemented with 2 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 2% glutamine, and 100 U/mL penicillin-0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cells (1×10^5 /mL) were stimulated with a toll-like receptor 4 agonist (TLR4) at conditions previously established (LPS 10 ng/mL, 24 h, 5%CO₂, 37°C) in 24-well plates in a final volume of 1 mL [30]. Then, the culture supernatants were collected, centrifuged (200g, 25°C, 10 min), and stored at -80°C for cytokine quantification, and PBMC were collected, washed with PBS 1x, and frozen at -80°C in a solution containing 90% FBS and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) for epigenetic analysis.

2.5. Cell Staining and Flow Cytometry. The frequency of classical noninflammatory (CD14⁺CD16⁻) and nonclassical proinflammatory (CD14⁺CD16⁺) circulating monocytes was determined in freshly isolated PBMCs of lean and obese individuals at rest and after strenuous exercise. Briefly, 2×10^5 cells/mL was stained with monoclonal antibodies conjugated with specific fluorochromes: anti-human CD14-FITC (clone 61D3; BIOGEMS, USA) and anti-human CD16-PE (clone B73.1; BIOGEMS, USA). After 15 minutes of incubation, cells were resuspended in 0.4 mL of PBS-BSA 1% and analyzed by flow cytometry. Cell phenotype was acquired using CELLQuest Pro Software (BD Bioscience, USA) on a FACS-Calibur flow cytometer (BD Bioscience, USA) equipped with a 15 mW argon laser-emitting light at a fixed wavelength of 488 nm. Fluorescent signals were collected in logarithmic mode (six-decade logarithmic amplifier). Monocytes were identified and gated according to their forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles. In monocyte gate, the percentage of CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ cells was determined based on fluorescence-1 (FL1-FITC) versus fluorescence 2 (FL2-PE) dot plots. Single color control tubes were used in each assay to account for spectral overlap. A minimal of 30,000 events of gated monocytes was acquired for analysis.

2.6. Leukocyte Counts and Levels of Metabolic Components. Total white cell count (WBC) were determined from vacutainer tubes containing EDTA (Becton Dickinson (BD) Juiz de Fora, MG, Brazil) in an automated analyzed ABX Micros60 (Horiba ABX, Kyoto, Japan). Fasting concentrations of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and triglycerides were determined in the serum by standard clinical laboratory methods, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines in an automated biochemical machine (BS120, BioClin, Brazil). Circulating cortisol and leptin levels were determined by enzyme immunoassay method (Monobind Inc., USA) following the manufacturer's recommendations. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) are byproducts of lipid peroxidation and represent markers of oxidative stress. Concentrations of TBARS in plasma were determined spectrofluometrically following a previously described protocol [31] and expressed in MDA nmol/mL. Total thiol concentrations were measured in plasma using 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) reagent [32].

Protein carbonyls were determined in plasma samples using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) spectrophotometric method described by Levine et al. [33]. Briefly, proteins of plasma samples (1 mL) were precipitated with 0.5 mL 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 1500g for 5 min, and the supernatant was discarded. In the following, 0.5 mL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 M HCl was added to precipitate protein and incubated at room temperature for 30 min. After incubation, 0.5 mL 10% TCA was added to the protein precipitate and centrifuged at 1800g for 5 min. The supernatant was discarded, the precipitate was washed twice with 1 mL ethanol/ethylacetate (1:1), and the supernatant was centrifuged out in order to remove the

free DNPH. The precipitate was dissolved in 1.5 mL protein dissolving solution (2 g SDS and 50 mg EDTA in 100 mL 80 mM phosphate buffer, pH 8.0) and incubated at 37°C for 10 min. The color intensity of the supernatant was measured using a spectrophotometer at 370 nm. Carbonyl content was calculated using the molar extinction coefficient ($21 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), and the results are expressed as nmol/mg protein.

2.7. Global Histone H4 Acetylation (H4ac) and Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Activity in PBMC. Histone extracts from PBMCs were prepared using a total histone extraction kit (EpiGentek) according to the manufacturer's protocol. H4ac levels in PBMCs were determined using the Global Histone H4 Acetylation Assay Kit (Colorimetric Detection, catalog number P-4009, EpiQuik, USA) according to the manufacturer's instructions and expressed as ng/mg protein. The protein concentration of each sample was measured by the Coomassie Blue method using bovine serum albumin as standard. The protein content of HDAC2 was measured using colorimetric EpiQuick HDAC2 assay kits (EpiGentek) according to the manufacturer's protocol. Results were calculated using a standard curve and expressed as ng/mg of protein.

2.8. Cytokines and Leptin Quantification. The concentrations of TNF- α (eBioscience, USA), IL-6 (eBioscience, USA), and IL-8 (PeproTech, USA) into the supernatants of LPS-stimulated or nonstimulated cells were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Serum levels of leptin were also evaluated using a commercial kit (PeproTech, USA). The intra-assay coefficient variation was always <7.5%.

2.9. Statistical Analysis. The SPSS 20.0 (IBM Inc., USA) software was used for statistical analysis. Data are reported as the mean $\pm$ Standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normality of the data. Demographic and anthropometric characteristics were compared between groups through an independent Student's *t*-test. A two-way analysis of variance was used with group (obese versus lean) and time (rest and after exercise) as factor with Bonferroni's correction to multiple analysis. Correlations were performed by Pearson's correlation coefficient. *p* values <0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Demographic and Metabolic Characteristics of Subjects and Nutritional Habits. Participant's characteristics are outlined in Table 1. As expected, obese individuals had higher body mass ($p < 0.001$), body mass index ($p < 0.001$), abdominal circumference ($p < 0.001$), waist circumference ($p < 0.001$), hip circumference ($p < 0.001$), and waist:hip ratio ($p < 0.001$) than lean individuals. The groups were homogeneous with respect to age, height, and cardiorespiratory fitness ($p > 0.05$), and no difference was observed regarding the serum glucose, total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides levels ($p > 0.05$).

TABLE 1: Demographic and metabolic characteristics of participants.

	Lean ($n = 10$)	Obese ($n = 10$)
Age (years)	47.71 $\pm$ 6.96	48.28 $\pm$ 4.19
Height (meters)	1.72 $\pm$ 0.07	1.74 $\pm$ 0.08
Body mass (kg)	66.67 $\pm$ 9.18	101.47 $\pm$ 16.25*
BMI (kg/m ²)	22.28 $\pm$ 1.91	32.98 $\pm$ 2.49*
WC (cm)	70.71 $\pm$ 5.02	99.57 $\pm$ 8.94*
AC (cm)	79.20 $\pm$ 3.37	99.57 $\pm$ 8.94*
HC (cm)	83.62 $\pm$ 3.21	103.46 $\pm$ 13.21*
WHR	0.83 $\pm$ 0.04	0.96 $\pm$ 0.02*
VO _{2Peak} (mL.kg ⁻¹ .min ⁻¹)	42.15 $\pm$ 5.49	38.47 $\pm$ 7.16
Glucose (mg/dL)	75.8 $\pm$ 6.70	82.7 $\pm$ 3.09
Total cholesterol (mg/dL)	168.7 $\pm$ 27.90	193.57 $\pm$ 40.10
HDL (mg/dL)	58.23 $\pm$ 10.25	52.17 $\pm$ 14.84
LDL (mg/dL)	116.47 $\pm$ 19.74	134.12 $\pm$ 34.27
Triglycerides (mg/dL)	80.76 $\pm$ 17.64	109.76 $\pm$ 41.15

Data presented as mean $\pm$ SD. AC: abdominal circumference; BMI: body mass index; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; WC: waist circumference; HC: hip circumference; WHR: waist:hip ratio. *Statistical difference between lean and obese groups ($p < 0.05$).

TABLE 2: Reported macronutrient intake in 24 h diet recall between groups.

	Lean	Obese
Total energy intake (kcal)	1972.36 $\pm$ 552.99	2524.05 $\pm$ 886.01*
Carbohydrates (%)	50.84 $\pm$ 9.71	52.85 $\pm$ 6.63
Carbohydrates (g)	281.95 $\pm$ 61.22	285.37 $\pm$ 91.75
Protein (%)	24.43 $\pm$ 6.87	18.12 $\pm$ 4.19*
Protein (g)	162.8 $\pm$ 41.90	145.4 $\pm$ 38.70*
Lipids (%)	26.73 $\pm$ 5.56	30.73 $\pm$ 8.91*
Lipids (g)	81.1 $\pm$ 30.45	90.36 $\pm$ 26.72*

Data presented as mean $\pm$ SD. *Statistical difference between lean and obese groups ($p < 0.05$).

As demonstrated in Table 2, obese individuals had higher total energy intake ($p = 0.02$) and amount of lipids (% , $p = 0.025$; g, $p = 0.029$) consumed than lean individuals. Moreover, differences were found in the amount of protein consumed between lean and obese individuals (% , $p = 0.036$; g, $p = 0.041$).

3.2. Exercise Intensity Markers. The duration of exercise was approximately 1275 $\pm$ 294 s in the lean group and 1023 $\pm$ 342 s in the obese group ($p = 0.029$). The average heart rate was 165.78 $\pm$ 6.72 bpm (88.3 $\pm$ 30% of HRMax) in the lean and 163.29 $\pm$ 3.97 (92.6 $\pm$ 28% of HRMax) in the obese group ($p > 0.05$). The average exertion perceived in the lean was 17.66 $\pm$ 0.89 and 18.72 $\pm$ 0.26 in the obese group ($p > 0.05$). Obese individuals performed significantly lower total number of repetitions than lean (482 $\pm$ 62.2 versus 572.2 $\pm$ 34.7; $p = 0.035$).

TABLE 3: Systemic biomarkers in lean and obese individuals at rest and after strenuous exercise.

	Time point	Lean	Obese
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	Rest	6.45 ± 1.50	6.58 ± 2.59
	Exercise	8.32 ± 2.42^a	8.61 ± 3.21^a
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	Rest	19.61 ± 4.05	31.02 ± 4.07^b
	Exercise	22.91 ± 4.51^a	$36.66 \pm 2.38^{a,b}$
Leptin (pg/mL)	Rest	22.15 ± 7.90	57.58 ± 14.33^b
	Exercise	22.97 ± 8.45	57.08 ± 11.26^b
TBARS (nmol/mL)	Rest	1.65 ± 0.52	1.72 ± 0.37
	Exercise	2.45 ± 0.59^a	2.67 ± 0.48^a
Protein carbonyl (nmol/mg protein)	Rest	1.25 ± 0.39	1.44 ± 0.43
	Exercise	1.67 ± 0.27^a	$1.98 \pm 0.36^{a,b}$
Total thiol ($\mu\text{mol/mL}$)	Rest	1.13 ± 0.21	1.18 ± 0.17
	Exercise	0.83 ± 0.19^a	0.78 ± 0.26^a

Data presented as mean $\pm$ SD. ^aStatistical difference compared to rest values ($p < 0.05$). ^bStatistical difference between groups ($p < 0.05$).

TABLE 4: Peripheral frequency of monocyte subsets in lean and obese individuals at rest and exercised conditions.

	% CD14 ⁺ CD16 ⁻ (noninflammatory)		% CD14 ⁺ CD16 ⁺ (proinflammatory)	
	Rest	Exercised	Rest	Exercised
Lean	82.31 ± 5.60	80.97 ± 8.31	11.16 ± 2.36	12.76 ± 2.21^a
Obese	80.81 ± 2.76	77.32 ± 9.01	15.55 ± 5.14^b	$19.92 \pm 5.91^{a,b}$

Data presented as mean $\pm$ SD. Values are expressed as the percentage of all gated CD14⁺ monocytes. ^aStatistical difference compared to rest values ($p < 0.05$). ^bStatistical difference between groups ($p < 0.05$).

3.3. Systemic Biomarkers in Response to Strenuous Exercise in Lean and Obese Subjects. At rest, in obese individuals, the cortisol ($p = 0.02$) and leptin ($p < 0.001$) levels were significantly higher compared with those found in lean individuals. In the lean group, the strenuous exercise induced a significant increase in WBC count ($p = 0.01$), cortisol ($p = 0.002$), protein carbonyls ($p = 0.042$), and TBARS ($p = 0.034$) levels and decreased the content of total thiols in plasma ($p = 0.03$). Similarly, obese individuals presented an elevation in WBC count ($p = 0.004$), cortisol concentrations ($p = 0.001$), protein carbonyls ($p = 0.026$), and TBARS response ($p = 0.025$) and a reduction in total thiol concentrations ($p = 0.032$) after strenuous exercise. In addition, after the exercise, plasmatic levels of cortisol ($p = 0.02$), leptin ($p < 0.001$), and protein carbonyls ($p = 0.042$) were higher in the obese group compared with the lean group (Table 3).

3.4. Effect of Strenuous Exercise in Classical and Nonclassical Monocytes Phenotype in Lean and Obese Individuals. The percentage of noninflammatory CD14⁺CD16⁻ and proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes freshly isolated is presented in Table 4. At rest, the percentage of proinflammatory monocytes tended to be higher in obese compared with lean individuals ($p = 0.06$), but no differences were observed in noninflammatory monocytes between groups ($p > 0.05$). However, the strenuous exercise induced a significant

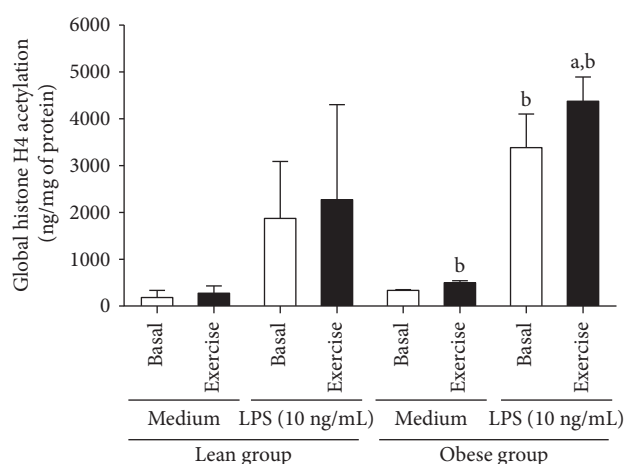


FIGURE 1: Global histone H4 acetylation levels in nonstimulated and LPS-stimulated PBMC isolated from lean and obese individuals in basal and exercised conditions. Data presented as mean $\pm$ SD. ^aStatistical difference from basal values ($p < 0.05$). ^bStatistical difference compared to lean group ($p < 0.05$).

increase in nonclassical proinflammatory monocytes in obese ($p = 0.016$) as well as in lean subjects ($p < 0.001$). At the end of the exercise, the percentage of CD16⁺ monocytes remained higher in obese compared with lean individuals ($p = 0.022$). No significant difference was observed in CD16⁻ monocytes in both groups ($p < 0.05$).

3.5. Effects of Exercise Stress and Immunological Challenge on Levels of Histone H4 Acetylation and HDAC2 Activity in PBMC from Obese Individuals. Figure 1 presents the effects of strenuous exercise on the levels of global H4ac in PBMC of lean and obese subjects before and after LPS challenge. PBMCs isolated from nonexercised lean and obese individuals presented similar levels of global H4ac when incubated *in vitro* in the presence of medium (lean 182.17 ± 152.55 ng/mg of protein; obese 336.33 ± 15.84 ng/mg of protein; $p > 0.05$). However, the stimulation of PBMC with

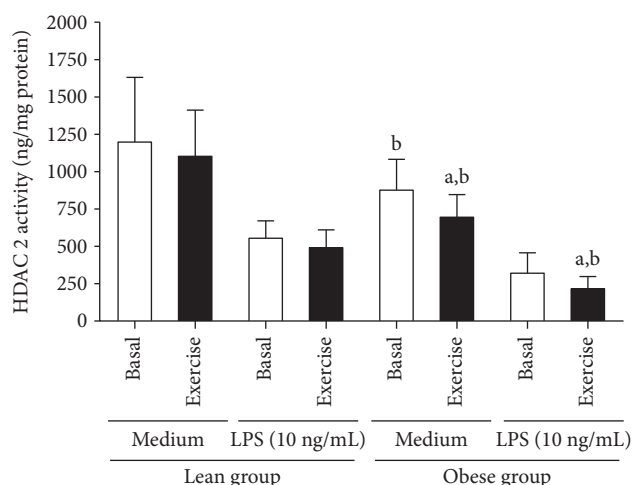


FIGURE 2: Global HDAC2 activity in nonstimulated and LPS-stimulated PBMC obtained from lean and obese individuals in basal and exercised conditions. Data presented as mean $\pm$ SD. ^aStatistical difference from basal values ($p < 0.05$). ^bStatistical difference compared to the lean group ($p < 0.05$).

LPS caused a significant hyperacetylation of H4ac in cells of obese (3382.89 ± 718.21 ng/mg of protein) compared with cells from individuals (1873.07 ± 1216.92 ng/mg of protein) ($p = 0.015$). Moreover, in obese individuals, the acute strenuous exercise increased the global H4ac in both nonstimulated ($p = 0.01$) and LPS-stimulated ($p = 0.04$) PBMC. In contrast, in the lean group, the exercise was not able to modulate the levels of H4ac in PBMC even after the challenge with LPS ($p > 0.05$).

Regarding the histone deacetylases, we evaluated the effect of strenuous exercise on HDAC2 activity in PBMC of obese individuals under basal and LPS-stimulated conditions. At baseline, lean individuals had higher activity of HDAC2 in LPS-stimulated PBMC (554.42 ± 116.63 ng/mg of protein) than obese individuals (320.14 ± 136.71 ng/mg of protein) ($p = 0.005$). At baseline, LPS-stimulated PBMC of lean presented higher HDAC2 activity (554.42 ± 116.63 ng/mg of protein) compared with those cells of obese individuals (320.14 ± 136.71 ng/mg of protein) ($p = 0.005$). No effect of exercise was observed on HDAC2 activity in both nonstimulated and LPS-stimulated PBMC of the lean group ($p > 0.05$). On the other hand, a significant reduction on HDAC2 activity in PBMC was observed after exercise in both nonstimulated ($p = 0.022$) and LPS-stimulated ($p = 0.030$) conditions in obese groups (Figure 2).

3.6. Cytokine Production. The production of IL-6 (Figure 3(a)), IL-8 (Figure 3(b)) and TNF- α (Figure 3(c)) by PBMC isolated from lean and obese subjects, at rest and exercised conditions, was evaluated after *in vitro* stimulation with LPS. At rest, compared with lean, PBMCs of obese individuals displayed an inflammatory profile in both nonstimulated and LPS-stimulated conditions. In this line, the production of IL-8 ($p = 0.024$) and TNF- α ($p = 0.015$) by nonstimulated cultured PBMC, as well as the production of IL-6 ($p < 0.001$), IL-8 ($p < 0.001$), and TNF- α ($p < 0.001$) by

LPS-stimulated cells was higher in obese compared with the lean group. In the lean group, PBMCs isolated from exercised individuals when cultured in the presence of medium (control), compared with nonexercised condition, produced a high amount of TNF- α ($p = 0.024$). In addition, when cells of exercised lean were stimulated *in vitro* with LPS, compared with the basal condition, a significant increase in IL-8 ($p = 0.039$) and TNF- α ($p = 0.039$) was observed. In the obese group, a significant increase in TNF- α ($p = 0.01$) was observed in nonstimulated cells after exercise compared to the rest condition. Moreover, a significant increase in LPS-stimulated condition, relative to IL-8 ($p = 0.02$) and TNF- α ($p < 0.001$) production, after exercise in obese individuals was observed. In addition, at the end of the exercise, significant differences between groups (lean and obese) were found in the levels of IL-8 ($p = 0.015$) and TNF- α ($p < 0.001$) secreted by nonstimulated PBMC and IL-6 ($p = 0.003$), IL-8 ($p = 0.001$), and TNF- α ($p < 0.001$) released by LPS-stimulated cells.

3.7. Correlations. Values of basal global H4ac in LPS-stimulated PBMC have a positive correlation with body mass ($r = 0.63$; $p = 0.01$), BMI ($r = 0.63$; $p = 0.01$), AC ($r = 0.66$; $p = 0.01$) and WC ($r = 0.57$; $p = 0.03$), and nonclassical proinflammatory monocytes ($r = 0.53$; $p = 0.05$). In addition, postexercise, the global H4ac was positively correlated with body mass ($r = 0.57$; $p = 0.03$), BMI ($r = 0.54$; $p = 0.04$), AC ($r = 0.55$; $p = 0.04$), and WC ($r = 0.56$; $p = 0.03$). Moreover, when we calculated the delta value (postexercise–basal values) of epigenetic and cytokine markers (TNF- α) to verify possible correlations between these variables induced by acute exercise, a positive correlation was found between delta value of global H4ac and delta value found for TNF- α production induced by LPS stimulation ($r = 0.75$; $p = 0.002$) (Table 5).

Regarding basal HDAC2 activity on LPS-stimulated PBMC, these parameters had negative correlations with body mass ($r = -0.60$; $p = 0.02$), BMI ($r = -0.70$; $p < 0.001$), AC ($r = -0.69$; $p < 0.01$), WC ($r = -0.79$; $p < 0.01$) and nonclassical proinflammatory monocytes ($r = -0.63$; $p = 0.01$). The HDAC2 activity in LPS-stimulated PBMC obtained from exercised individuals also presented negative correlations with body mass ($r = -0.70$; $p < 0.01$), BMI ($r = -0.84$; $p < 0.001$), AC ($r = -0.69$; $p < 0.01$), and nonclassical proinflammatory monocytes ($r = -0.66$; $p < 0.001$) (Table 6).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study describing the influence of strenuous exercise on the acetylation status of histone H4 and HDAC2 activity in PBMC of obese individuals. Our results showed that, at rest, LPS-stimulated PBMC of obese individuals presented high H4ac levels and low HDAC2 activity compared with lean. In obese men, the acute strenuous exercise increased the global H4ac and reduced the HDAC2 activity in both nonstimulated and LPS-stimulated PBMC. Moreover, the exercise induced a significant increase in nonclassical proinflammatory monocytes and a marked increase in the production of proinflammatory

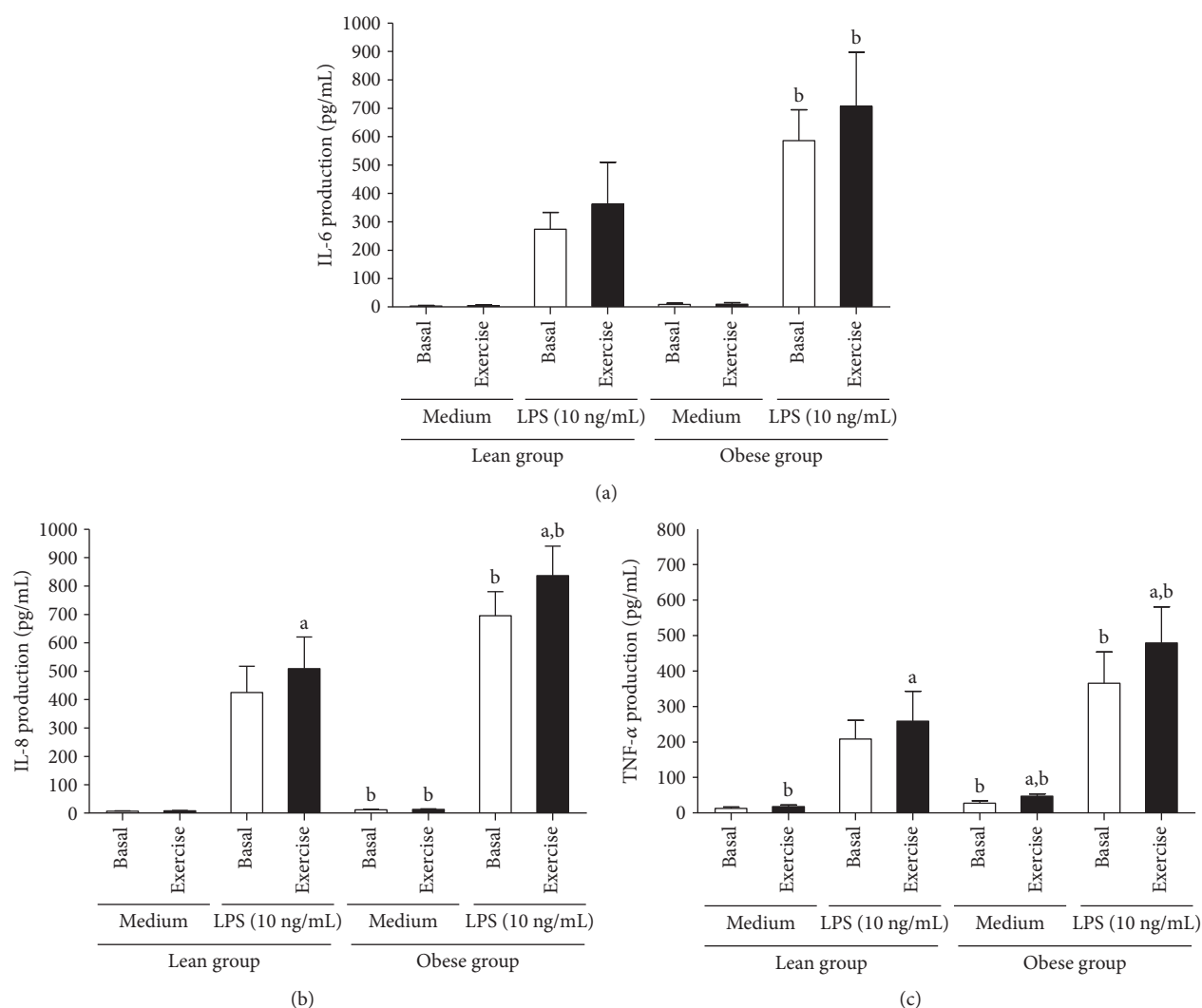


FIGURE 3: Production of IL-6 (a), IL-8 (b), and TNF- α (c) by nonstimulated and LPS-stimulated PBMC obtained from lean and obese individuals in basal and exercised conditions. Data presented as mean $\pm$ SD. ^aStatistical difference from basal values ($p < 0.05$). ^bStatistical difference compared to the lean group ($p < 0.05$).

TABLE 5: Correlation of H4ac status of LPS-stimulated PBMC and anthropometric, proinflammatory monocyte, and delta (Δ) value of TNF- α before and after exercise.

	Levels of H4ac in LPS-stimulated PBMC (ng/mg of protein)		
	Before	After	Δ (after-before)
Body mass (kg)	0.63 (0.01)	0.57 (0.03)	N.S.
BMI (kg/m ²)	0.63 (0.01)	0.54 (0.04)	N.S.
AC (cm)	0.66 (0.01)	0.55 (0.04)	N.S.
WC (cm)	0.57 (0.03)	0.56 (0.03)	N.S.
CD14 ⁺ CD16 ⁺ (%)	0.53 (0.05)	N.S.	N.S.
Δ TNF- α	N.S.	N.S.	0.75 ($p = 0.002$)

Pearson's Correlation presented as r (p value). p values were considered significant when ≤ 0.05 . AC: abdominal circumference; BMI: body mass index; TNF- α : tumour necrosis factor- α ; WC: waist circumference; N.S.: nonsignificant correlation.

TABLE 6: Correlation of HDAC2 activity of LPS-stimulated PBMC and anthropometric and monocyte subset before and after exercise.

	HDAC2 activity in LPS-stimulated PBMC (ng/mg of protein)	
	Before	After
Body mass (kg)	-0.60 (0.02)	-0.70 (<0.01)
BMI (kg/m ²)	-0.70 (<0.001)	-0.84 (<0.001)
AC (cm)	-0.69 (<0.01)	-0.69 (<0.01)
WC (cm)	-0.79 (<0.01)	N.S.
CD14 ⁺ CD16 ⁺ (%)	-0.63 (0.01)	-0.66 (<0.001)

Pearson's correlation presented as r (p value). p values were considered significant when ≤ 0.05 . AC: abdominal circumference; BMI: body mass index; WC: waist circumference; N.S.: nonsignificant correlation.

cytokines, IL-8 and TNF- α , especially in obese men. Taken together, these results suggest that the excess of fat mass alters the acetylation events and the chromatin remodeling in PBMCs.

Obese individuals reported higher total energy intake and lipid consumption when compared to lean subjects. High-fat diets are reported to induce changes in proinflammatory gene expression and key genes related to lipid metabolism in PBMC [34]. The acute and long-term lipid consumption correlates with the upregulation of genes related to inflammation such as CD16A, MCP-1, IL-6, TNF- α , and p65 in PBMC and adipose tissue [35]. In fact, obese mice treated with hypercaloric and high-fat diet had altered cytokine expression in peritoneal macrophages after LPS stimulation [36]. Thus, the higher amount of lipid consumption and total energy intake by obese individuals impacts on proinflammatory status of PBMC. However, we highlight that in our study, the obese group did not present systemic lipid metabolism deregulation, as demonstrated by the absence of changes in lipid parameters compared to lean.

The epigenetic modulation across altered DNA methylation and histone modification have been linked to the dysfunction of the immune system in obese individuals [7]. In our study, the chronic low-grade inflammation observed in obesity was associated with hyperacetylation of histone H4 in PBMC. Previous studies have also shown that leukocytes from obese individuals presented a proinflammatory status [4, 5, 37]. In this sense, Ghanim and coworkers [4] described that PBMC from obese individuals had deregulated NF- κ B expression and proinflammatory cytokines expression than matched lean controls. In addition, monocytes of obese individuals present an M1 phenotype, characterized by the CD14⁺CD16⁺ expression, elevated expression of TLR-4 and TLR-8, and a large amount of TNF- α and IL-6 production, after PBMC stimulation with nonesterified fatty acids [38, 39]. Collectively, these data are in accordance with our results regarding the proinflammatory phenotype of PBMC of obese men, which produced high amounts of proinflammatory IL-6, IL-8, and TNF- α . In this way, we found positive correlations between basal H4ac levels in LPS-stimulated PBMCs and anthropometric markers (i.e., BMI, AC, and WC) that confirm the close relationship between obesity and histone H4 hyperacetylation.

Interesting, both M1 phenotype and enhanced NF- κ B expression are dependent on H4ac levels [12, 13]. In this sense, previous studies demonstrated that the proinflammatory polarization of human monocytes by interferon gamma or LPS plus TNF- α is regulated by H4ac status [13, 40]. Moreover, Tsaprouni et al. [15] described that the enhancement of gene transcription of IL-8 and TNF- α is widely dependent on histone 3 and 4 acetylation, which enhances the inflammatory gene transcription after *in vitro* LPS stimulation. Indeed, the immunosuppressive action of glucocorticoids involves deacetylation of histone H4 in proinflammatory promoter genes via augmentation of HDAC2 activity [19].

However, our study revealed that the higher levels of cortisol found in the obese group have no effect in acetylation-deacetylation events in PBMC of obese

individuals. In fact, the immunosuppressive action of cortisol in LPS-stimulated monocytic production of TNF- α was inhibited in obese subjects [41]. Thus, the impaired cortisol action on PBMC of obese individuals may contribute to the enhancement in proinflammatory cytokine production and histone H4 hyperacetylation in obesity. On the other hand, *in vitro* data revealed that leptin increased the activation of MAPKs/NF- κ B pathway through acetylation of histone H4 [42]. As the expansion of adipose tissue in obesity is accompanied by the augmentation of leptin, we hypothesized that leptin may play a key role in H4ac status in PBMC of the obese.

In the present study, *in vitro* stimulation with LPS significantly increased the H4ac levels and decreased HDAC2 activity in PBMCs from both lean and obese individuals. In fact, H4ac is widely involved in the gene transcription after LPS stimulation [43]. Mechanistically, the decreased HDAC2 activity may occur through oxidative stress [44] or polarizing signals like cytokines or endocrine factors [12, 43]. In fact, HDAC2 depletion can lead to the increase of inflammatory gene expression via free NF- κ B [45]. Thus, the decreased HDAC2 activity in obesity may be a potential target for pharmacological or exercise-based therapies.

In this study, obese individuals presented low tolerance to exercise, demonstrated through short duration of exercise bout and low number of repetitions before reaching a state of exhaustion compared to lean individuals. However, similar HR response and perceived exertion were found at the end of the exercise between groups. In fact, excess body fat increases the oxygen cost and cardiorespiratory load during submaximal or exhaustive exercises [46]. On the other hand, while the cardiac output and stroke volume in response to exhaustive exercise seems to be altered in obese individuals, the oxygen consumption and HR response were not altered indicating that the ability of the cardiorespiratory system to transport oxygen to the exercised muscle during strenuous exercise was not impaired in obese individuals [47]. Thus, while obesity may have an impact on exercise tolerance, the excess of body fat has little impact on cardiovascular response as indicated by similar HR response and the percentage of HR maximal reached immediately after strenuous exercise.

Acute strenuous exercise also increased the oxidative damage markers (TBARS and protein carbonyls) and caused a reduction in total thiols content in both groups. Increases in ROS production during and after exercise can occur through different mechanisms, including increased oxidative phosphorylation and electron leakage in the electron transport system, activation of xanthine oxidase pathway, NADPH oxidase activity in peripheral phagocytes, as well as, impaired calcium homeostasis, mechanical stress, and ischemia-reperfusion events [48]. Moreover, TBARS and protein carbonyl levels seem to be responsive to maximal intensity exercise and the degree of muscle damage induced by exercise, but the same result was not observed after a submaximal intensity exercise [49]. After exercise, obese individuals displayed higher concentrations of protein carbonyls compared to lean. Proteins are major targets for ROS, and an increased protein oxidation has been previously reported [49]. Obesity

is associated with higher levels of oxidative stress that causes oxidative damage to proteins, lipids, and DNA molecule. In addition, sedentary obese individuals are more susceptible to oxidative damage due to reduced enzymatic antioxidant activity [48]. In this way, future studies should be conducted in order to evaluate the acute effects of strenuous exercise on antioxidant enzymes (i.e., catalase, superoxide dismutase) of obese individuals.

This study sheds light on the exercise-induced epigenetic changes on immune cells. We demonstrated that strenuous exercise induced an increase in global H4ac and decrease in HDAC2 activity in LPS-stimulated PBMC of obese individuals. In our study, the absence of changes in HDAC2 activity and global H4ac status in both nonstimulated and LPS-stimulated PBMC of lean individuals after strenuous exercise corroborates previous reports on epigenetic changes in PBMC from healthy individuals in response to acute exercise [50, 51]. On the other hand, the densitometric units from acetylated histone 4 on lysine 5 (H4K5) were significantly elevated after a half marathon in both cancer patients and healthy controls [52]. Interestingly, a single bout of vigorous exercise enhanced NF- κ B DNA-binding activity in PBMC from healthy individuals [53]. In addition, recently, we demonstrated that a single bout of high-intensity interval exercise (HIIE) was able to elevate the global activity of HDAC in PBMC of obese individuals [26] and the systemic levels of IL-10 and TGF- β , suggesting that HDAC plays an important role in the immunoregulatory activity of HIIE. Exercise-induced epigenetic changes in PBMC seems to be exercise-dependent, since acetylation-deacetylation events or DNA methylation returned to basal values 24 h after HIIE or moderate-continuous exercise [26, 50], while strenuous exercise was able to maintain higher histone acetylation status 24 h after bout [52]. However, most studies did not evaluate the epigenetic changes 24 h after exercise [25, 51]. Thus, we believed that the histone modifications in PBMC and the inflammatory response are dependent of the type and intensity of exercise.

The BMI status is another important key regarding histone modifications in response to exercise. In our study, a positive correlation was found between postexercise global H4ac levels and anthropometric markers such as body mass, BMI, and trunk circumferences related to central adiposity. In this line, Lavratti et al. [23] demonstrated that a reduction in global H4ac of phytohemagglutinin-stimulated PBMC of schizophrenic patients was accompanied by weight loss following 90 days of combined strength plus endurance exercise training. Thus, the reduction in histone acetylation status altered the production of IL-6, IFN- γ , and TNF- α after moderate exercise training [8, 23].

As expected, we found that strenuous exercise increased the proinflammatory IL-8 and TNF- α production by PBMC of obese and lean individuals after *in vitro* treatment with LPS. Moreover, in the obese group, the peripheral frequency of nonclassical proinflammatory monocytes was higher after exercise compared to the lean group. Interestingly, this proinflammatory status enhanced by strenuous exercise in obese men was accompanied by increase acetylation status of histone H4 in PBMC. Reinforcing this, a strong positive

correlation between delta values of TNF- α and H4ac levels in PBMC of obese individuals was found. Elevations in the production of LPS-induced proinflammatory cytokines after exhaustive exercise were previously reported [21, 54, 55]. Moreover, strenuous exercise induces a significant decrease in corticosteroid sensitivity in peripheral immune cells [56]. This may indicate that impaired cortisol immunosuppression action after exercise can contribute to the increase of H4ac in LPS-stimulated PBMC and the higher cytokine production after the bout. In addition, the elevation in protein carbonyls after exercise in obese individuals may contribute to H4ac and proinflammatory response. Indeed, previously *in vitro* data revealed that the treatment with hydrogen peroxide induces IL-8 promoter hyperacetylation and reduces the HDAC activity in bronchial epithelial cells [57]. Thus, H4ac status alters the cell phenotype and cytokine production pattern of both innate and adaptive immunity [16, 49].

Some studies have demonstrated that an acute bout of strenuous exercise induced a significant increase in nonclassical monocyte proportion in both healthy [58–60] and obese individuals [61, 62]. It was postulated that the greater catecholaminergic response, the degree of muscle damage and oxidative stress response mediates the proinflammatory monocyte mobilization. In fact, CD14⁺CD16⁺ monocytes showed a rapid and transient increase after epinephrine infusion in healthy men [63]. On the other hand, some reports described that CD16⁺ monocytes are preferentially removed from the bloodstream in healthy individuals following 1 h of recovery after exercise [60]. Thus, fat mass may impact on selective CD14⁺CD16⁺ monocyte tissue mobilization after strenuous exercise. Contributing to this, leptin promotes the development and selective mobilization of CD16⁺ monocytes and the *in vitro* TNF- α production by stimulated monocytes [64]. Thus, the histone H4 hyperacetylation status after strenuous exercise contributes to a polarization to the nonclassical monocyte phenotype in obese individuals.

5. Conclusion

In conclusion, this study provides evidence that a single session of strenuous exercise induces an imbalance between H4ac and HDAC2 activity and increases the proinflammatory response. Collectively, the data suggests an influence of epigenetic machinery in the immunomodulatory effects promoted by exercise.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/MCTI2014), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for financial support. Pedro R. T. Romão and Pedro Dal Lago also thank CNPq for fellowships. The

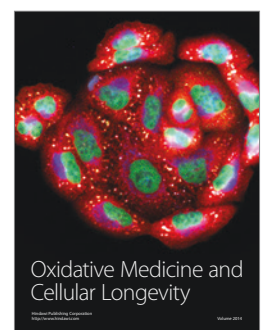
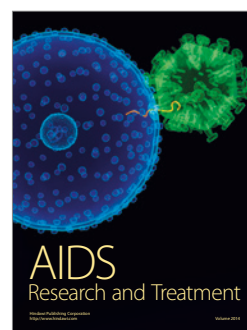
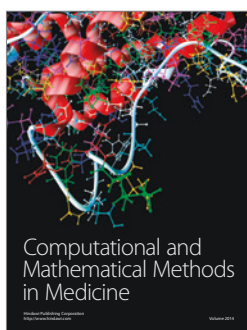
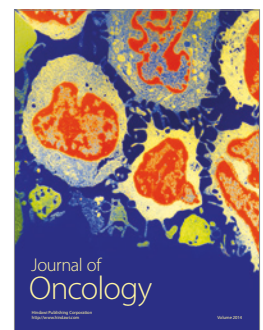
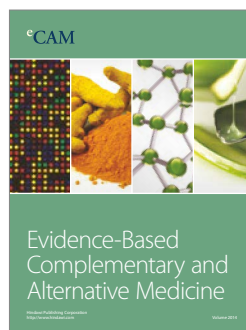
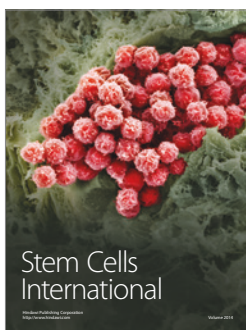
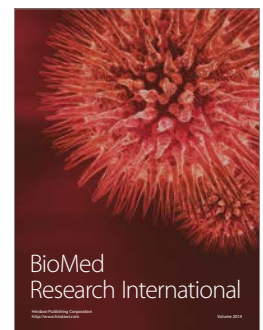
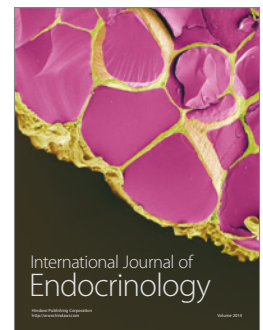
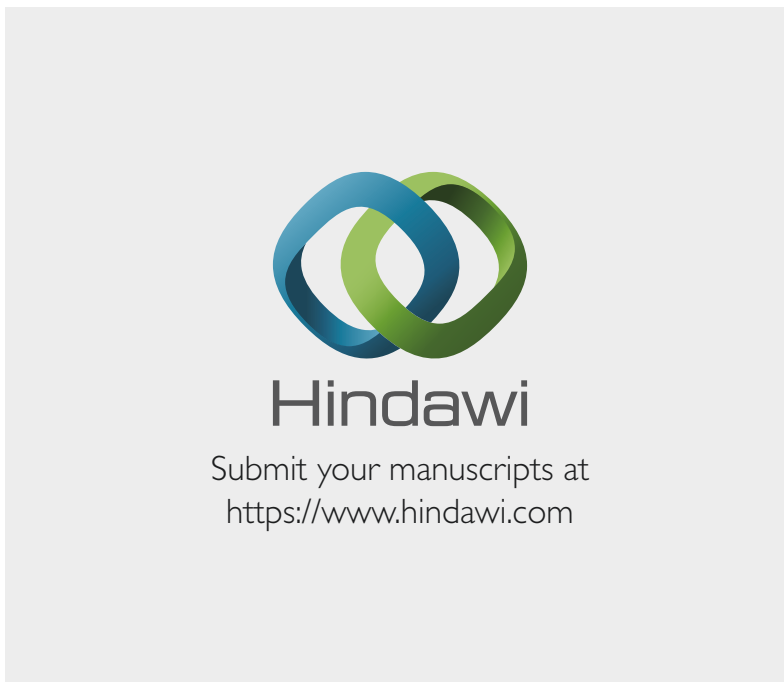
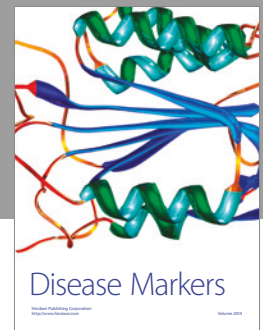
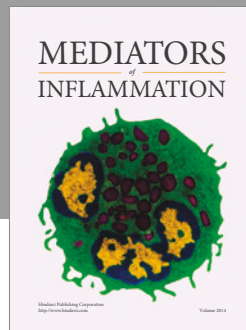
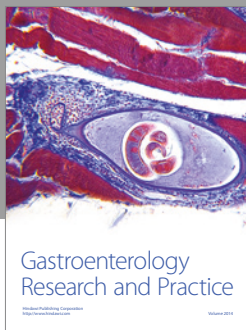
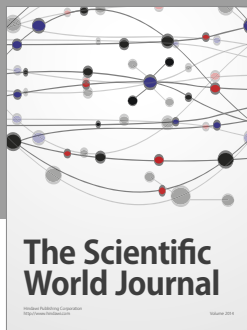
data from this work was previously presented as a poster presentation at the “3rd Eric Newsholme Research Symposium—Metabolic Regulation” (São Paulo, Brazil/2016).

References

- [1] G. A. Bray, G. Fruhbeck, D. H. Ryan, and J. P. Wilding, “Management of obesity,” *The Lancet*, vol. 387, no. 10031, pp. 1947–1956, 2016.
- [2] K. M. Flegal, B. K. Kit, H. Orpana, and B. I. Graubard, “Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis,” *The Journal of the American Medical Association*, vol. 309, pp. 71–82, 2013.
- [3] M. F. Gregor and G. S. Hotamisligil, “Inflammatory mechanisms in obesity,” *Annual Review of Immunology*, vol. 29, pp. 415–445, 2011.
- [4] H. Ghanim, A. Aljada, D. Hofmeyer, T. Syed, P. Mohanty, and P. Dandona, “Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state,” *Circulation*, vol. 110, pp. 1564–1571, 2004.
- [5] W. H.-H. Sheu, T.-M. Chang, W.-J. Lee et al., “Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women,” *Obesity*, vol. 16, pp. 1033–1038, 2008.
- [6] G. P. Dorneles, D. O. Haddad, V. O. Fagundes et al., “High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals,” *Cytokine*, vol. 77, pp. 1–9, 2016.
- [7] S. Raghuraman, I. Donkin, S. Versteyhe, R. Barrès, and D. Simar, “The emerging role of epigenetics in inflammation and immunometabolism,” *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 27, pp. 782–795, 2016.
- [8] M. Abu-Farha, A. Tiss, A. Abubaker Khadir et al., “Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity,” *PLoS One*, vol. 8, article e75342, 2013.
- [9] A. Eberhardter and P. B. Becker, “Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin,” *EMBO Reports*, vol. 3, pp. 224–229, 2002.
- [10] T. Agaloti, G. Chen, and D. Thanos, “Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene,” *Cell*, vol. 111, pp. 381–392, 2002.
- [11] D. Schubeler, D. M. MacAlpine, D. Scalzo et al., “The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote,” *Genes & Development*, vol. 18, pp. 1263–1271, 2004.
- [12] Z. Zhang, L. Song, K. Maurer, A. Bagashev, and K. E. Sullivan, “Monocyte polarization: the relationship of genome-wide changes in H4 acetylation with polarization,” *Genes and Immunity*, vol. 12, pp. 445–456, 2011.
- [13] S. Garrett, K. Dietzmann-Maurer, L. Song, and K. E. Sullivan, “Polarization of primary human monocytes by IFN- γ induces chromatin changes and recruits RNA Pol II to the TNF- α promoter,” *Journal of Immunology*, vol. 180, pp. 5257–5266, 2008.
- [14] A. H. Coles, H. Gannon, A. Cerny, E. Kurt-Jones, and S. N. Jones, “Inhibitor of growth-4 promotes I κ B promoter activation to suppress NF- κ B signaling and innate immunity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, pp. 11423–11428, 2010.
- [15] L. G. Tsaprouni, K. Ito, N. Punchard, and I. M. Adcock, “Triamcinolone acetonide and dexamethasone suppress TNF- α -induced histone H4 acetylation on lysine residues 8 and 12 in mononuclear cells,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 973, pp. 481–483, 2002.
- [16] D. Nicholas, H. Tang, Q. Zhang et al., “Quantitative proteomics reveals a role for epigenetic reprogramming during human monocyte differentiation,” *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 14, pp. 15–29, 2015.
- [17] B. P. Ashburner, S. D. Westerheide, and A. S. Baldwin Jr., “The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 21, pp. 7065–7077, 2001.
- [18] K. Ito, S. Yamamura, S. Essilfie-Quaye et al., “Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, pp. 7–13, 2006.
- [19] L. Hoffman-Goetz and B. K. Pedersen, “Exercise and the immune system: a model of the stress response?,” *Immunology Today*, vol. 15, pp. 382–387, 1994.
- [20] N. P. Walsh, M. Gleeson, R. J. Shephard et al., “Position statement. Part One: immune function and exercise,” *Exercise Immunology Review*, vol. 17, pp. 6–63, 2011.
- [21] M. D. Phillips, M. G. Flynn, B. K. McFarlin, L. K. Stewart, K. L. Timmerman, and H. Ji, “Resistive exercise blunts LPS-stimulated TNF- α and IL-1 β ,” *International Journal of Sports Medicine*, vol. 29, pp. 102–109, 2008.
- [22] R. Terra, P. J. Alves, S. A. Gonçalves da Silva, V. P. Salerno, and P. M. Dutra, “Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO production in BALB/c mice,” *International Journal of Sports Medicine*, vol. 34, pp. 661–666, 2013.
- [23] C. Lavratti, G. Dorneles, D. Pochmann et al., “Exercise-induced modulation of histone H4 acetylation status and cytokines levels in patients with schizophrenia,” *Physiology & Behavior*, vol. 168, pp. 84–90, 2016.
- [24] J. Denham, F. Z. Marques, E. L. Bruns, B. J. O’Brien, and F. J. Charchar, “Epigenetic changes in leukocytes after 8 weeks of resistance exercise training,” *European Journal of Applied Physiology*, vol. 116, pp. 1245–1253, 2016.
- [25] S. Horsburgh, S. Todryk, C. Toms, C. N. Moran, and L. Ansley, “Exercise-conditioned plasma attenuates nuclear concentrations of DNA methyltransferase 3B in human peripheral blood mononuclear cells,” *Physiological Reports*, vol. 3, 2015.
- [26] G. P. Dorneles, I. R. V. da Silva, A. Korb et al., “High intensity interval exercise enhances the global HDAC activity in PBMC and anti-inflammatory cytokines of overweight-obese subjects,” *Obesity Medicine*, vol. 2, pp. 25–30, 2016.
- [27] American College of Sports Medicine, *Guidelines for Exercise Testing and Prescription*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 7th edition, 2006.
- [28] J. M. Saxton, D. Claxton, E. Winter, and A. G. Pockley, “Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage,” *Clinical Science*, vol. 104, pp. 69–77, 2003.
- [29] H. M. Bicalho, C. M. Gontijo, and J. A. Nogueira-Machado, “A simple technique for simultaneous human leukocytes separation,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 40, pp. 115–116, 1981.

- [30] C. J. Huang, E. O. Acevedo, D. C. Mari, C. Randazzo, and Y. Shibata, "Glucocorticoid inhibition of leptin- and lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production in obesity," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 35, pp. 163–168, 2014.
- [31] H. Ohkawa, N. Ohishi, and K. Yagi, "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction," *Analytical Biochemistry*, vol. 95, pp. 351–358, 1979.
- [32] G. L. Ellman, "Tissue sulfhydryl groups," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 82, pp. 70–77, 1959.
- [33] R. L. Levine, D. Garland, C. N. Oliver et al., "Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins," *Methods in Enzymology*, vol. 186, pp. 464–478, 1990.
- [34] B. Reynés, E. García-Ruiz, A. Palou, and P. Oliver, "The intake of high-fat diets induces an obesogenic-like gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells, which is reverted by dieting," *The British Journal of Nutrition*, vol. 115, pp. 1887–1895, 2016.
- [35] D. M. Rocha, J. Bressan, and H. H. Hermsdorff, "The role of dietary fatty acid intake in inflammatory gene expression: a critical review," *Sao Paulo Medical Journal*, vol. 135, pp. 157–168, 2017.
- [36] C. B. Lawrence, D. Brough, and E. M. Knight, "Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide," *Disease Models & Mechanisms*, vol. 5, pp. 649–659, 2012.
- [37] D. Dicker, M. A. Salook, D. Marcoviciu, M. Djaldetti, and H. Bessler, "Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection," *Obesity Facts*, vol. 6, pp. 146–151, 2013.
- [38] E. F. Devevre, M. Renovato-Martins, K. Clément, C. Sautès-Fridman, I. Cremer, and C. Poitou, "Profiling of the three circulating monocyte subpopulations in human obesity," *Journal of Immunology*, vol. 194, pp. 3917–3923, 2015.
- [39] C. O. De Loera-Rodriguez, V. Delgado-Rizo, A. Alvarado-Navarro, J. M. Agraz-Cibrian, J. E. Segura-Ortega, and M. Fafutis-Morris, "Over-expression of TLR4-CD14, pro-inflammatory cytokines, metabolic markers and NEFAs in obese non-diabetic Mexicans," *Journal of Inflammation*, vol. 11, p. 39, 2014.
- [40] J. Shen, Y. Liu, X. Ren et al., "Changes in DNA methylation and chromatin structure of pro-inflammatory cytokines stimulated by LPS in broiler peripheral blood mononuclear cells," *Poultry Science*, vol. 95, pp. 1636–1645, 2016.
- [41] T. Cheng, S. Dimitrov, C. Pruitt, and S. Hong, "Glucocorticoid mediated regulation of inflammation in human monocytes is associated with depressive mood and obesity," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 66, pp. 195–204, 2016.
- [42] P.-S. Hsu, C.-S. Wu, J.-F. Chang, and W. N. Lin, "Leptin promotes cPLA2 gene expression through activation of the MAPK/NF- κ B/p300 cascade," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, pp. 27640–27658, 2015.
- [43] S. Li, G. Fossati, C. Marchetti et al., "Specific inhibition of histone deacetylase 8 reduces gene expression and production of proinflammatory cytokines *in vitro* and *in vivo*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, pp. 2368–2378, 2015.
- [44] F. M. Moodie, J. A. Marwick, C. S. Anderson et al., "Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF- κ B activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells," *The FASEB Journal*, vol. 18, pp. 1897–1899, 2004.
- [45] S. R. Yang, A. S. Chida, M. R. Bauter et al., "Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF- κ B and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages," *American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 291, pp. L46–L57, 2006.
- [46] M. Hulens, G. Vansant, R. Lysens, A. L. Claessens, and E. Muls, "Exercise capacity in lean versus obese women," *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, vol. 11, pp. 305–309, 2001.
- [47] C. A. Vella, R. Y. Zubia, S. F. Burns, and D. Ontiveros, "Cardiac response to exercise in young, normal weight and overweight men and women," *European Journal of Applied Physiology*, vol. 105, pp. 411–419, 2009.
- [48] S. Medeiros Nda, F. G. de Abreu, A. S. Colato et al., "Effects of concurrent training on oxidative stress and insulin resistance in obese individuals," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 697181, 6 pages, 2015.
- [49] A. Sakelliou, I. G. Fatouros, I. Athanailidis et al., "Evidence of a redox-dependent regulation of immune responses to exercise-induced inflammation," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2016, Article ID 2840643, 19 pages, 2016.
- [50] P. J. Robson-Ansley, A. Saini, C. Toms et al., "Dynamic changes in DNA methylation status in peripheral blood mononuclear cells following an acute bout of exercise: potential impact of exercise induced elevations in interleukin-6 concentration," *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, vol. 28, pp. 407–417, 2010.
- [51] F. P. Da Silveira, C. Basso, W. Raupp et al., "BDNF levels are increased in peripheral blood of middle-aged amateur runners with no changes on histone H4 acetylation levels," *The Journal of Physiological Sciences*, vol. 67, no. 6, pp. 681–687, 2017.
- [52] P. Zimmer, W. Bloch, A. Schenk et al., "Exercise-induced natural killer cell activation is driven by epigenetic modifications," *International Journal of Sports Medicine*, vol. 36, pp. 510–515, 2015.
- [53] S. Y. Kim, T. W. Jun, Y. S. Lee, H. K. Na, Y. J. Surh, and W. Song, "Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor- κ B DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1171, pp. 464–471, 2009.
- [54] J. C. Rosa, F. S. Lira, R. Eguchi et al., "Exhaustive exercise increases inflammatory response via toll like receptor-4 and NF- κ Bp65 pathway in rat adipose tissue," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 226, pp. 1604–1607, 2011.
- [55] G. A. Selkirk, T. M. McLellan, H. E. Wright, and S. G. Rhind, "Expression of intracellular cytokines, HSP72, and apoptosis in monocyte subsets during exertional heat stress in trained and untrained individuals," *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 296, pp. R575–R586, 2009.
- [56] R. H. DeRijk, J. Petrides, P. Deuster, P. W. Gold, and E. M. Sternberg, "Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans," *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 81, pp. 228–235, 1996.
- [57] K. Tomita, P. J. Barnes, and I. M. Adcock, "The effect of oxidative stress on histone acetylation and IL-8 release," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 301, pp. 572–577, 2003.
- [58] S. Random-Aizik, F. P. Zaldivar Jr, F. Haddad, and D. M. Cooper, "Impact of brief exercise on circulating monocyte

- gene and microRNA expression: implications for atherosclerotic vascular disease,” *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 39, pp. 121–129, 2014.
- [59] M. P. Gustafson, A. C. DiCostanzo, C. M. Wheatley et al., “A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood,” *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 5, p. 30, 2017.
- [60] R. J. Simpson, B. K. McFarlin, C. McSporran, G. Spielmann, B. ó Hartaigh, and K. Guy, “Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans,” *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 23, pp. 232–239, 2009.
- [61] R. Wonner, S. Wallner, E. Orsó, and G. Schmitz, “Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients,” *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 2016.
- [62] M. A. De Matos, T. C. Duarte, V. O. Ottone et al., “The effect of insulin resistance and exercise on the percentage of CD16⁺ monocyte subset in obese individuals,” *Cell Biochemistry and Function*, vol. 34, pp. 209–216, 2016.
- [63] S. Dimitrov, T. Lange, and J. Born, “Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine,” *Journal of Immunology*, vol. 184, pp. 503–511, 2010.
- [64] J. G. Cannon, G. Sharma, G. Sloan et al., “Leptin regulates CD16 expression on human monocytes in a sex-specific manner,” *Physiological Reports*, vol. 9, p. 2, 2014.



5. CAPÍTULO III

5.1 Artigo Original - Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells following high intensity interval exercise

Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells following high intensity interval exercise

Gilson P Dorneles [1,2], Igor M da Silva [1], Alessandra Peres [3,4]*, Pedro R T Romão [2,5]*

1Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, 2Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

3Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

4Graduate Program in Nutrition Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

5Graduate Program in Biosciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Running Ahead title: Exercise and ectonucleotidases on T cells

*Corresponding Authors:

Pedro R.T. Romão and Alessandra Peres. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. UFCSPA. Rua Sarmiento Leite, 245. 90050-170. Porto Alegre - RS, Brasil. Phone++55(51)33039000.

E-mail addresses: pedror@ufcspa.edu.br (P.R.T. Romão); peres@ufcspa.edu.br (A. Peres)

Publicado na revista Journal of Cellular Biochemistry

Fator de Impacto: 2.959

Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ CD25⁻ and CD4⁺ CD25⁺ T cells following high intensity interval exercise

Gilson P. Dorneles^{1,2}  | Igor M. da Silva¹ | Alessandra Peres^{3,4}  |
Pedro R. T. Romão^{2,5} 

¹Department of Basic Health Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

²Department of Basic Health Sciences, Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³Department of Basic Health Sciences, Graduate Program in Rehabilitation Sciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁴Department of Basic Health Sciences, Graduate Program in Nutrition Sciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁵Department of Basic Health Sciences, Graduate Program in Biosciences, Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Correspondence

Pedro R. T. Romão and Alessandra Peres, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre UFCSA, Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: pedror@ufcsa.edu.br; peres@ufcsa.edu.br

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Abstract

Aim: To investigate the impact of physical fitness on the mobilization of CD4⁺CD25⁻CD39⁺ and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells in response to acute exercise.

Methods: Fifteen high physical fitness (25.3 ± 1.4 years) and 15 low physical fitness (26.1 ± 1.9 years) men performed a single bout of high-intensity interval exercise (HIIE, 10 bouts of 60 seconds at 85% HRmax intercepted by 75 seconds of recovery at 50% HRmax). Blood lymphocytes were isolated before, immediately after and 1 hour after exercise for assessment of cell surface expression of CD25, CD39, and CD73 on CD4⁺ T cells. Effector memory T cells (mTeff) were identified by CD4⁺CD25⁻CD39⁺ coexpression, and memory regulatory T cells (mTReg) were defined as CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells.

Results: Exercise increased CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cell frequencies immediately after followed by a decrease below to baseline values at 1 hour after the bout in both low and high physical fitness groups. At baseline, the proportions of mTeff were higher, while mTreg were lower in low physical fitness individuals. The frequency of mTreg increased immediately after HIIE in both groups, and remained higher 1 hour after the bout. However, high physical fitness individuals presented higher mTreg frequency in all periods evaluated. A significantly mobilization of mTeff cells was identified in both groups immediately after HIIE. High physical fitness individuals displayed a decrease in mTeff cells below to baseline, while the frequency of mTeff remained higher in low physical fitness group 1 hour after the bout. The peripheral frequency of CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells increased in a similar way immediately after the bout in both groups, returning to the baseline values 1 hour after exercise. No differences in CD4⁺CD25⁻CD73⁺ T cells were observed after HIIE in both groups.

Conclusion: Our results highlight the impact of physical activity status in the redistribution of CD4⁺ T cells expressing ectonucleotidases in response to HIIE.

KEYWORDS

aerobic fitness, effector memory T cells, interval exercise, memory regulatory T cells

1 | INTRODUCTION

Acute exercise-induced lymphocytosis and the recruitment of lymphocytes to the peripheral blood are markedly dependent of the exercise mode, volume, and intensity of the session.¹ The leukocyte redistribution with a typically drop in lymphocyte counts below to baseline value is observed after the acute exercise.² Several subject's characteristics, such as physical activity status and gender impact on immune cells demargination in response to exercise.³ In this way, alterations in peripheral T cell subpopulations in response to exercise are well established, and characterized by the redistribution of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with senescent/effector phenotype.⁴ The trafficking pattern of T cells is largely driven by the increase in cardiac output, shear-stress and higher catecholamine discharge during exercise.⁵

Recently, exercise-induced mobilization of immunoregulatory cells, mainly regulatory T cells (Treg cells) and hematopoietic stem cells, was recognized as one of the main mechanism by which exercise modulates the immune response and attenuate the inflammatory response in physically active individuals.^{6,7} In the recent years, the participation of the purinergic system in the modulation of immune response has been evidenced. In this context, T cells metabolize adenosine triphosphate (ATP) into adenosine to induce immunomodulatory responses, mainly through the Treg cells.⁸ Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (ENTPD1, CD39) is an ectoenzyme, expressed in several cells including leukocytes, that hydrolyzes ATP and adenosine diphosphate (ADP) to adenosine monophosphate (AMP).^{9,10} Subsequently, ecto-5'-nucleotidase (CD73) converts AMP to adenosine, which is a well-known immunosuppressive metabolite.¹¹

It was reported that the expression of CD39 in combination with CD4 and CD25 surface markers identifies four distinct T cell populations into the peripheral blood of humans: CD4⁺CD25⁺CD39⁺ (activated/memory Treg, mTreg); CD4⁺CD25⁺CD39⁻ (pro-T helper subset; Th); CD4⁺CD25⁻CD39⁺ (memory T effector cell; mTeff) and CD4⁺CD25⁻CD39⁻ T cells (naïve T effector cell, nTeff).¹² These populations are extensively dynamic and can be tracked during the inflammatory response.^{9,13} Moreover, patients with renal allograft rejection had reduced CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg frequency and higher CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells. In this way, CD39 and CD73 are important molecules for the management of the duration, magnitude, and composition of immune response.¹²

Data reporting the impact of acute physical exercise on the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ T cells are lacking. Our group and others have reported the immunomodulatory effects of high intensity interval

exercise (HIIE) in sedentary, obese, type 2 diabetic and healthy individuals.^{7,14-18} It was demonstrated that a single bout of HIIE enhanced the peripheral frequency of Treg cells and increased the rate of apoptosis of highly differentiated T cells.⁷ In addition, HIIE was able to increase the immunomodulatory interleukin-10 (IL-10) in obese and lean individuals and transforming growth factor β (TGF- β ; in obese), and decrease the concentrations of IL-8 without altering the levels of IL-17a and TNF- α .^{15,16}

Thus, the exercise-induced immune response may be influenced by the expression of ectonucleotidases on T cells. In this way, this study aimed to evaluate the impact of acute HIIE on the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ CD25⁻ and CD4⁺ CD25⁺ T cells in healthy men. Given the well-known impact of high aerobic fitness status on immunomodulatory effects of exercise, we also verified the differential mobilization of CD4⁺ T cells subsets in active vs sedentary individuals.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Participants

Fifteen high physical fitness (25.3 ± 1.4 years) and 15 low physical fitness (26.1 ± 1.9 years) healthy men were recruited from Porto Alegre (Brazil). The criteria for physically active was the completion of at least 3 hours of endurance training per week, for a minimum of 3 years and a maximal oxygen consumption (VO_{2max}) of at least 52 mL/kg/min. Individuals who reported less than 100 minutes of physical activity per week, not engaging in regular exercise training for at least 2 years was defined as physically inactive/sedentary. Before experimental trials, all individuals completed a medical health questionnaire, the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ; <https://sites.google.com/site/theipaq/>) and the Physical Activity Readiness Questionnaire (PAR-Q).

This study was approved by the UFCSPA Research Ethics Committee (protocol 1.973.432). All participants gave their written informed consent and the study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki 2013. Participants were nonsmokers, had normocaloric diet and not taking any medications or supplements known to affect metabolic or immune systems. Exclusion criteria included excessive alcohol intake (>10 drinks/week), autoimmune, cardiac, endocrine or metabolic diseases, acute and chronic infections that would impact study outcomes. All participants refrained any form of exercise within 48 hours of each laboratory visit and were asking to refrain alcohol and caffeine beverages 12 hours prior the lab visits.

2.2 | Preliminary trials

Participants attended at the laboratory on three different days, with an interval of 7 days, after an overnight fast. During visit 1, participants completed a medical questionnaire, the IPAQ, and were screening to ensure that they met the study inclusion/exclusion criteria. Eligible participants returned for a second visit to complete a body composition evaluation and an incremental cardiopulmonary exercise testing (CPX). All experimental trials were completed between 08:00 and 10:00 am. During the trials, the temperature and humidity of the room were continuously controlled (18–24°C and humidity 50–70%).

A qualified professional performed all anthropometric evaluations, and all tests were performed three times and the average was used for analysis. Body mass (kg) and height (m) were determined by a semianalytical scale (Welmy, Santa Barbara D'Oeste, Brazil), with capacity for 200 kg and a stadiometer attached (Welmy) with an accuracy of 0.1 kg and 0.005 cm, respectively. Waist circumference (WC, cm) circumference was measured through an inelastic measuring tape.

The CPX was performed on electric treadmill (Centurion 300; Micromed, Brasilia, Brazil) using a ramp protocol.¹⁹ Exercise test started at 4.5 km/hour and no slope for all study participants. Then, the load (speed and slope) was individually increased for each participant considering their physical condition and tolerance. The load test was designed to obtain $\text{VO}_{2\text{peak}}$ within 8 to 12 minutes, followed by 1 minute of active recovery (speed and slope similar to the initial test data) and 5 minutes of passive recovery. Both the speed and incline of the treadmill gradually increased up to the maximum limit of the participant. The test was terminated after verification of the following circumstances: (a) request of the participant due to extreme tiredness and/or perception of the intense sensation of dyspnea; (b) attained the maximum heart rate (HR) predicted by age (HR_{max}) was $\geq 85\%$; (c) peak respiratory exchange ratio $\text{RER} > 1.1$; (d) VO_2 plateau was reached even with increasing workload.¹⁹ Ventilatory and metabolic parameters were collected by respiration using Metalyzer 3B (Cortex, Leipzig, Germany) and were analyzed after the mean of the data in eight respiratory cycles. The CPX system was calibrated before each test with respect to both airflow and O_2 and CO_2 analyzers. The average of the last 30 seconds of the test was used to determine the $\text{VO}_{2\text{peak}}$.

2.3 | Main trial

Exercise trial was undertaken in the morning at least 7 days after preliminary measurements. Participants performed a warm-up (5 minutes) at a workload eliciting

40% HR_{max} . HIIE consisted in 10 bouts of 60 seconds (85–90% P_{Max}) alternated with 75 seconds of recovery (50% P_{max}) in a motorized treadmill.¹⁷ Ratings of perceived exertion (RPE) were monitored using Borg scale and HR was monitored by telemetry (Polar, Kempele, Finland) after each interval bout during HIIE.

2.4 | Blood sampling and PBMC isolation

Blood samples (approximately 10 mL) were collected from the antecubital vein in pre, immediately, and after HIIE. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from peripheral blood from participants using histopaque gradient solution, Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) as described before.²⁰ PBMC viability was determined by trypan blue exclusion and the viability was always more than 95%. Then, the cells were washed and suspended in Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 2 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 2% glutamine, and 100 U/mL penicillin – 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich).

2.5 | Cell staining and flow cytometry

Cells were stained for 30 minutes at 4°C with monoclonal antibodies (5 μL) conjugated with specific fluorochromes: anti-human CD4 PercP-Cy5.5 (clone SK3), anti-human CD25 FITC (clone M-A251), anti-human CD39 PE (clone TU66), anti-human CD73 PE (clone AD2) (all from BD Bioscience, San Jose, CA) followed by wash with phosphate-buffered saline (PBS) (1 $\times$, pH 7.4) for 5 minutes (300g). Then, cells were suspended in 0.4 mL of PBS-bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) 1% and analyzed by flow cytometry. Cell phenotype was acquired using CELLQuest Pro Software (BD Bioscience) on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ) equipped with a 15 mW argon laser-emitting light at a fixed wavelength of 488 nm. Fluorescent signals were collected in logarithmic mode (six-decade logarithmic amplifier). Lymphocytes were identified and gated according to each forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles. In lymphocyte gate, the peripheral frequency of CD4^+ , $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$, $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD39}^+$, $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD39}^+$, $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD73}^+$, and $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD73}^+$ T cells were evaluated. In accordance with Dwyer et al¹² we defined $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD39}^+$ as mTeff cells and $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD39}^+$ as mTreg cells. CD39 and CD73 density expression was also assessed as mean fluorescence intensity (MFI) on $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ and $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ T cell subpopulations. Single color control tubes were

used in each assay to account for spectral overlap. A minimal of 30 000 events were acquired for analysis.

2.6 | Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 20.0 (SPSS Inc, IBM, Chicago, IL). After the normality test by Shapiro-Wilk, all values were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Participant's characteristics and baseline frequencies of CD4⁺ subsets were compared through unpaired the Student *t* test. Two-way repeated measurement analysis of variance, taking time and group as factors, were performed followed by Bonferroni's post hoc for multiple comparisons. Correlations were checked by the Pearson correlation coefficient. A $P \leq 0.05$ was adopted in all analysis.

3 | RESULTS

3.1 | Subjects characteristics and exercise responses

Table 1 shows the demographic characteristics of the low physical fitness and high physical fitness participants. There were no differences in age, height, body mass, body mass index, or WC between the groups ($P > 0.05$). HR at rest was

TABLE 1 Participant's characteristics and acute exercise response

	Low physical fitness	High physical fitness
Age, y	25.3 $\pm$ 1.4	26.1 $\pm$ 1.9
Height, m	1.75 $\pm$ 0.03	1.76 $\pm$ 0.02
Body mass, kg	70.8 $\pm$ 3.68	71.3 $\pm$ 2.20
BMI, kg/m ²	23.5 $\pm$ 1.5	23.7 $\pm$ 1.3
WC, cm	77.23 $\pm$ 5.74	76.87 $\pm$ 8.57
HR at rest, bpm	68.21 $\pm$ 8.21	59.09 $\pm$ 5.72*
VO _{2max} , L/min	2.93 $\pm$ 0.41	3.87 $\pm$ 0.38*
VO _{2max} , mL/kg/min	41.29 $\pm$ 2.74	55.82 $\pm$ 3.19*
HRmax, bpm	183 $\pm$ 8.92	182 $\pm$ 6.78
Exercise response		
Heart rate, bpm	143.29 $\pm$ 5.91	155.32 $\pm$ 3.20*
Relative HR, % from max	78.30 $\pm$ 2.91	85.34 $\pm$ 3.28*
PSE	15.21 $\pm$ 0.81	14.59 $\pm$ 1.23
Speed during bouts, km/h	10.89 $\pm$ 1.44	15.24 $\pm$ 1.82*

Abbreviations: BMI, body mass index; HR, heart rate; PSE, perceived subjective exertion; VO_{2max}, maximal oxygen consumption; WC, waist circumference.

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation.

*Denotes statistical difference compared with sedentary group ($P < 0.05$).

lower in high physical fitness group ($P = 0.034$). In response to CPX, high physical fitness participants presented higher absolute VO_{2max} ($P = 0.021$), relative VO_{2max} ($P = 0.01$), despite no differences in HRmax ($P > 0.05$). Acute HIIE lasted approximately 30 minutes in both groups. The average HR during HIIE was 155.32 $\pm$ 3.20 bpm (85.34% of HRmax) for high physical fitness group and 143.29 $\pm$ 5.91 (78.30% of HRmax) for low physical fitness group ($P = 0.042$). The average RPE in high physical fitness group was 14.59 $\pm$ 1.23, and 15.21 $\pm$ 0.81 for low physical fitness group ($P > 0.05$). Moreover, participants with high physical fitness running at higher speed during interval bouts than low physical fitness subjects ($P = 0.031$ for speed bout).

3.2 | Aerobic fitness correlates with baseline CD4⁺CD25⁺CD39⁺ and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells

The VO_{2max} values positively correlated with the baseline frequencies of mTreg cells (CD4⁺CD25⁺CD39⁺) ($r = 0.69$; $P < 0.001$) (Figure 1A). Moreover, a negative correlation between VO_{2max} and mTeff cells (CD4⁺CD25⁺CD39⁺) ($r = -0.59$; $P < 0.001$) was identified (Figure 1B). No significant correlations were identified between the values of VO_{2max} and the proportions of CD4⁺CD25⁺CD73⁺, CD4⁺CD25⁺CD73⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells ($P > 0.05$).

3.3 | The impact of physical fitness status on mobilization of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells after HIIE

The acute response of CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells to HIIE are presented in Table 2. Acute HIIE induced a significantly increase in CD4⁺ T cell frequency immediately after the bout ($P = 0.01$ for both groups), decreasing below to baseline values after 1 hour in both groups ($P = 0.025$ for high physical fitness group; $P = 0.038$ for low physical fitness group). The expression of CD25 on cell surface of CD4⁺ T cells increased immediately after the bout in both groups ($P = 0.01$). A significantly decrease in CD4⁺CD25⁺ T cell proportions below to baseline was observed 1 hour after HIIE in low physical fitness group ($P = 0.38$), without difference in high physical fitness group ($P > 0.05$).

3.4 | The impact of physical activity status on mobilization of CD4⁺CD25⁺CD39⁺ and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells after HIIE

The acute response of mTreg (CD4⁺CD25⁺CD39⁺, Figure 2A) and mTeff (CD4⁺CD25⁺CD39⁺, Figure 2B) cells were presented in Figure 2. The baseline proportions

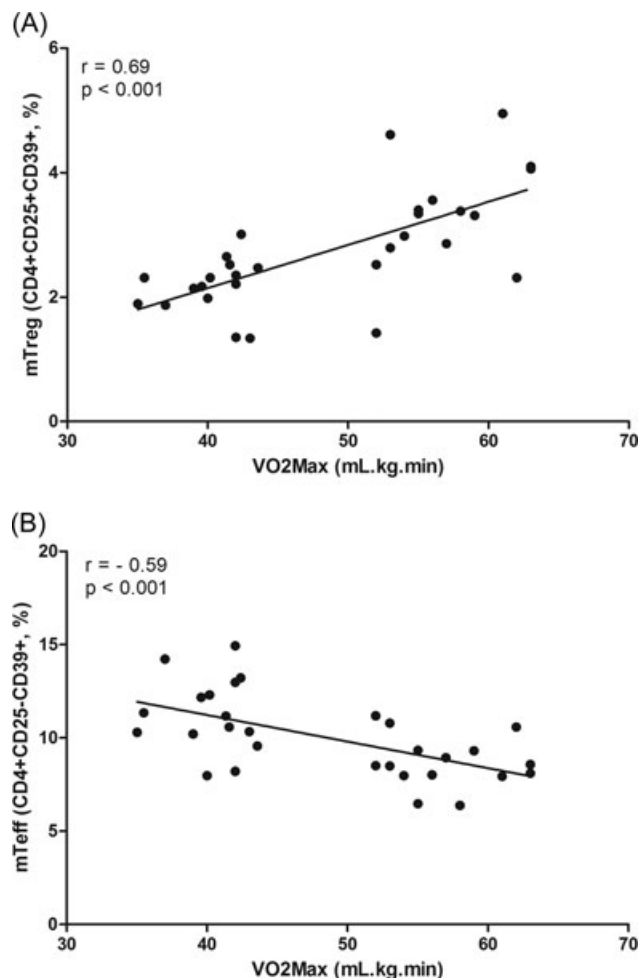


FIGURE 1 Correlations between the VO_{2max} values and baseline proportions of mTreg ($CD4^+CD25^+CD39^+$) (A) and mTeff ($CD4^+CD25^-CD39^+$) T cells (B) in young men. Correlation analyses were performed through the coefficient of the Pearson correlation ($P < 0.05$)

of mTreg ($P = 0.042$) and mTeff ($P = 0.034$) were different between the groups. Acute HIIE increased the peripheral frequencies of mTreg and mTeff cells in both low physical fitness ($P = 0.038$; $P = 0.042$, respectively) and high physical fitness group ($P = 0.03$; $P = 0.027$, respectively) immedi-

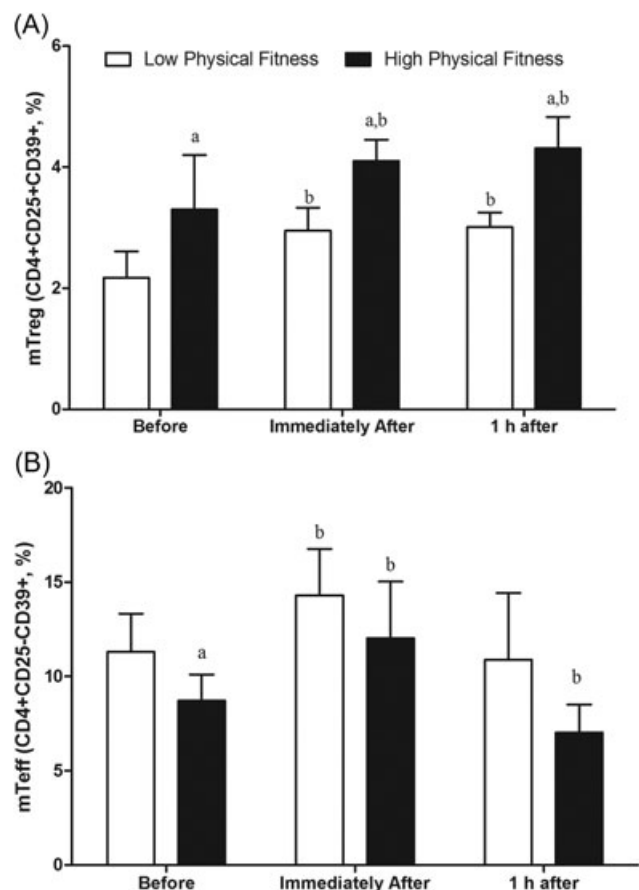


FIGURE 2 The acute response of mTreg ($CD4^+CD25^+CD39^+$; A) and mTeff ($CD4^+CD25^-CD39^+$; B) cells to a single bout of HIIE in low physical fitness and high fitness and men. ^aDenotes statistical difference compared with sedentary group ($P < 0.05$). ^bDenotes statistical difference compare to before HIIE ($P < 0.05$). HIIE, high-intensity interval exercise

ately after bout. The frequency of mTreg remained higher 1 hour after HIIE in high physical fitness ($P = 0.04$) and low physical fitness ($P = 0.045$) individuals. However, the frequency of mTeff decreased below to baseline in high physical fitness individuals ($P = 0.042$) 1 hour after HIIE,

TABLE 2 The acute response of $CD4^+$ and $CD4^+CD25^+$ T cells to a single bout of HIIE in low and high physical fitness individuals

	Before	Immediately after	1 h after
CD4 + T cells (%)			
Low physical fitness	44.28 ± 3.51	48.96 ± 2.87*	41.29 ± 3.52*
High physical fitness	45.64 ± 3.78	49.57 ± 3.64*	40.29 ± 3.95*
CD4 + CD25 + T cells (%)			
Low physical fitness	6.12 ± 2.85	8.85 ± 2.74*	4.87 ± 2.19*
High physical fitness	7.34 ± 2.81	9.93 ± 1.73*	7.67 ± 4.86

Abbreviation: HIIE, high-intensity interval exercise.

Data are expressed as mean ± standard deviation.

*Denotes statistical differences compared with before HIIE ($P < 0.05$).

without differences in low physical fitness individuals compared with baseline values ($P > 0.05$).

3.5 | The impact of physical activity status on mobilization of $CD4^+CD25^-CD73^+$ and $CD4^+CD25^+CD73^+$ T cells

The acute response of $CD4^+CD25^+CD73^+$ (Figure 3A) and $CD4^+CD25^-CD73^+$ T cells (Figure 3B) are presented in Figure 3. At baseline no significant differences between groups were observed in CD73 expression on $CD4^+CD25^-$ and $CD4^+CD25^+$ T cells. Acute HIIE increased the peripheral frequency of $CD4^+CD25^+CD73^+$ T cells immediately after bout in both groups ($P = 0.02$ for high physical fitness group; $P = 0.038$ for low physical fitness group), returning to baseline values 1 hour after exercise ($P > 0.05$). No significant differences were observed in CD73 expression on $CD4^+CD25^-$ T cells immediately and 1 hour after HIIE in both groups ($P > 0.05$).

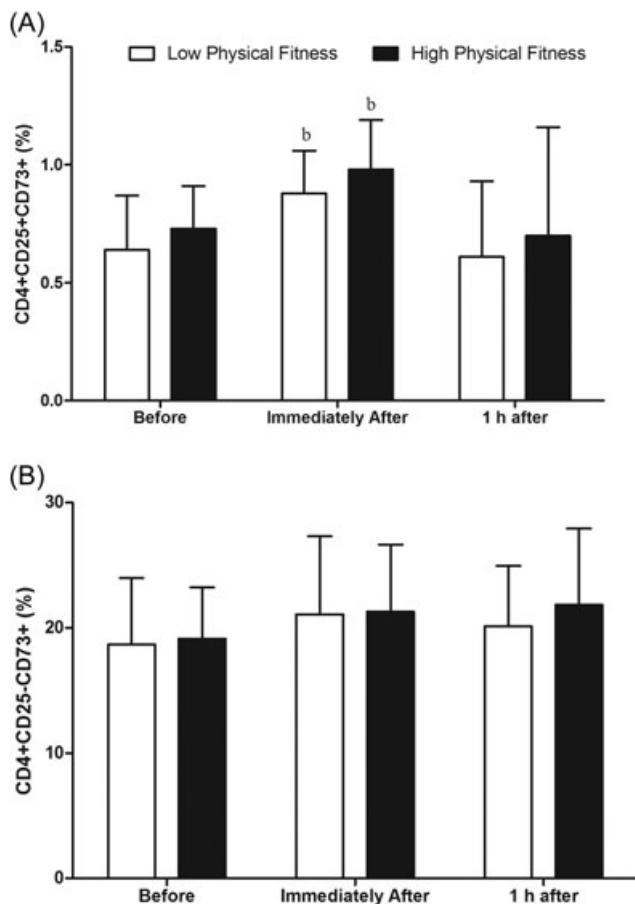


FIGURE 3 The acute response of $CD4^+CD25^+CD73^+$ (A) and $CD4^+CD25^-CD73^+$ (B) T cells to a single bout of HIIE in low physical fitness and high fitness and men. ^bStatistical difference compared to before HIIE ($P < 0.05$). HIIE, high-intensity interval exercise

3.6 | The impact of physical activity status on MFI of CD39 and CD73 in $CD4^+CD25^-$ and $CD4^+CD25^+$ T cells after HIIE

We assessed the expression of CD39 (Figure 4A) and CD73 (Figure 4B) on cell surface of $CD4^+CD25^-$ and $CD4^+CD25^+$ T cells in response to HIIE. At baseline the MFI of CD39 on $CD4^+CD25^+$ T cells was higher in high physical fitness group compared with low physical fitness group ($P = 0.038$). In low physical fitness group, acute HIIE increased the expression of CD39 on $CD4^+CD25^-$ ($P = 0.021$) and $CD4^+CD25^+$ T cells ($P = 0.03$) immediately after bout, remaining higher 1 hour after HIIE on $CD4^+CD25^-$ ($P = 0.042$) and $CD4^+CD25^+$ T cells ($P = 0.035$). High physical fitness group displayed significant increase in CD39 expression on $CD4^+CD25^-$ ($P = 0.025$) and $CD4^+CD25^+$ T cells ($P = 0.039$).

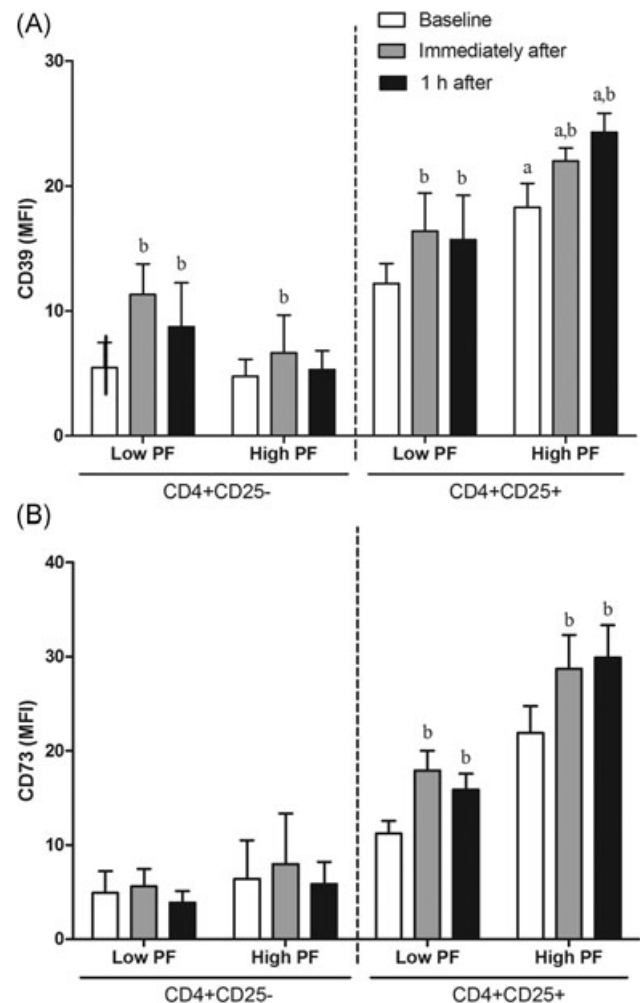


FIGURE 4 The expression of CD39 (A) and CD73 (B) on $CD4^+CD25^-$ and $CD4^+CD25^+$ T cells in response to a single bout of HIIE in low physical fitness and high fitness and men. ^aDenotes statistical difference compared with sedentary group ($P < 0.05$). ^bDenotes statistical difference compared to before HIIE ($P < 0.05$). HIIE, high-intensity interval exercise; PF, physical fitness

Furthermore, CD39 MFI remained higher on CD4⁺CD25⁺ ($P = 0.033$) T cells while the expression of CD39 on CD4⁺CD25⁻ T cells returned to baseline ($P > 0.05$) after 1 hour of the bout. The expression of CD39 on CD4⁺CD25⁺ T cells was higher in high physical fitness group compared with low physical fitness group immediately after ($P = 0.03$) and 1 hour after ($P = 0.025$) bout. No significant differences were identified in CD73 MFI on CD4⁺CD25⁻ T cells in response to HIIE ($P > 0.05$). The expression of CD73 on CD4⁺CD25⁺ T cells increased immediately after bout in both groups ($P = 0.01$ for both), remaining higher 1 hour after HIIE ($P = 0.042$ for low physical fitness group; $P = 0.023$ for high physical fitness group).

4 | DISCUSSION

Acute exercise induces several phenotypic changes in T cells influencing the immunosurveillance.² Here, we showed for the first time that a single HIIE mobilizes circulating CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg, CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff and CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells in individuals with different levels of physical fitness. One hour after the bout, mTeff decreased below to the baseline in high physical fitness group, while mTreg remained higher in both groups. The frequencies of CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells returned to the baseline values after HIIE. Collectively, our findings denote that exercise exerts great impact on CD4⁺CD25^{-/+} T cells expressing ectonucleotidases CD39 and CD73, despite the impact of fitness capacity on mTeff redistribution after exercise. Moreover, HIIE increased the expression of ectonucleotidases CD39 on CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells and CD73 on CD4⁺CD25⁺ T cells surface in both groups.

Firstly, we identified that VO_{2max} positively correlated with CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg cells, and inversely correlated with CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells. Despite these new findings, the relationship of aerobic fitness with T cell markers is not surprise. Spielmann et al²¹ showed that aerobic fitness was associated with lower accumulation of senescent T cells at rest in the peripheral blood of healthy men. Upon antigen presentation, activated and senescent T cells presented upregulation of CD39 expression to induce lymphocyte proliferation and cytokine production.¹⁰ Higher frequencies of CD4⁺CD25⁻CD39⁺ T cells are found in inflamed tissues, that is, renal allograft and knee joint, producing higher levels of interferon and IL-17a.^{9,12} Previous data indicate that chronic inflammatory conditions, such as obesity and kidney disease, are characterized by peripheral increased in the proportion of mTeff cells.^{12,22} Interestingly, we identified higher expression of CD39 and CD73 in CD4⁺CD25⁺ compared with CD4⁺CD25⁻ T cells, highlighting the differential role of ectonucleotidases in

CD4⁺ T cells subsets. Thus, the negative correlation between VO_{2max} and CD4⁺CD25⁻CD39⁺ T cells may indicate the proinflammatory status of these cells in low aerobic fitness individuals.

On the contrary, the positive correlation between VO_{2max} and mTreg cells highlights the impact of aerobic fitness status on immunoregulatory cells. Previous observational studies identified higher proportions of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg cells in endurance trained athletes compared with sedentary individuals, demonstrating the role of aerobic fitness on Treg cells.^{23,24} Thus, the analysis of the CD39 expression in CD4⁺ T cells adds new knowledge on the impact of physical fitness status on the immune system. It has been reported that CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells have a regulatory phenotype,²⁵ so subjects with higher VO_{2max} may have higher percentages of Treg cells with this phenotype.

High-intensity exercise has a profound impact on the mobilization and redistribution of T cells during and after exercise than moderate-intensity exercises.⁷ Here, we showed that a single bout of HIIE mobilized CD4⁺ T cells expressing CD25, CD39, and CD73 molecules on cell surface. It was observed that the expression level (MFI) of CD39 and CD73 on CD4⁺CD25⁺ T cells were higher immediately and 1 hour after HIIE in both groups. In relation to CD4⁺CD25⁻ T cells, only CD39 had their expression increased after the bout.

Activated CD4⁺ T cells, evaluated through the expression of CD25, occurred immediately after HIIE in both sedentary and physically active groups. Mobilization of CD4⁺CD25⁺ T cells is mediated through sympathetic nervous response, increasing the trafficking of activated CD4⁺ T cells in peripheral blood in response to stress situations.²⁶ Some data indicate that the surface expression of CD25 transiently increases after high-intensity exercise.^{27,28} In contrast, no changes in CD4⁺CD25⁺ T cell frequency were observed after a single HIIE in sedentary individuals.¹⁸ These different findings may be explained by exercise mode (treadmill vs cycle ergometer) and the initial physical fitness from our subjects (low physical fitness individuals: 41.29 mL/kg/min; higher physical fitness individuals: 55.82 mL/kg/min) compared with those who participated in the formed study (33.6 mL/kg/min).¹⁸

We also showed for the first time the modulation of CD39 expression on CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells in response to acute HIIE. A significantly mobilization of CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg cells was observed immediately after HIIE in both sedentary and physically active individuals. The increase of ectonucleotidase enzymes in PBMC positively correlated with lower inflammatory markers such as IL-6 and C reactive protein after 30 weeks of exercise training (endurance plus strength exercises) in metabolic syndrome patients.²⁹ In response to acute exercise, Moritz et al³⁰ demonstrated higher activity of ectonucleotide pyrophosphatase/

phosphodiesterase and lower levels of ATP/ADP in the peripheral blood after moderate exercise in young men, suggesting an augment in CD39 activity. However, vigorous exercise did not impact the expression of CD39 in T cells of sedentary and active individuals.³¹ It is necessary to emphasize that some methodological points, mainly the lack of CD4⁺ phenotyping in previous studies, impairs the directly comparison with our findings.

CD39 is a rate-limiting enzyme that hydrolyzes ATP or ADP to AMP. Furthermore, CD39 is upregulated in CD4⁺CD25⁻ T cells during acute and chronic inflammation, stimulating the production of higher levels of IL-17a and interferon.^{9,12} In fact, the increased CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells after HIIE is consistent with previous studies who observed acute mobilization of effector memory T cells with a highly differentiated and inflammatory phenotype after exercise.³² Moreover, Kruger et al⁷ showed that the increase of effector differentiated T cells in the circulation was higher compared with low differentiated T cells. It is supposed that HIIE induces higher mobilization of mTeff cells from secondary lymphoid organs through repeated sympathetic stimulation during the bout.³²

Interestingly, in our study, only high physical fitness group presented a redistribution of CD4⁺CD25⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells below to the baseline values 1 hour after the bout. The CD39 MFI on CD4⁺CD25⁻ T cells also returned to the baseline values 1 hour after HIIE in high physical fitness group, remaining higher in low physical fitness group. Previously, Simpson et al⁵ pointed out that effector T cells mobilized during exercise tend to present a phenotype associated with tissue migration. Moreover, it was demonstrated that acute HIIE increases apoptosis markers on highly differentiated T cells.⁷ Thus, in our study the decrease of circulating CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells can be due to apoptosis or redistribution to peripheral tissues. Similarly to us, Minuzzi et al³³ showed lower frequencies of CD4⁺CD27⁻CD45ra⁻KLRG1⁺ (effector memory) and CD4⁺KLRG1⁺T cells 1 hour after exercise in masters athletes.

In this way, the decrease in CD4⁺CD25⁻CD39⁺ mTeff cells frequency may also be related to the anti-inflammatory effects of exercise in high physical fitness individuals. Interestingly, high-intensity exercise decreases the expression of interferon γ in CD4⁺ T cells until 1 hour after session.³⁴ The fact of this pattern of decreasing mTeff after exercise was not observed in low physical fitness group indicate that sedentary subjects may experience some degree of acute inflammation in response to HIIE. A recent study described that the higher physical fitness may be required to the high-intensity exercise induces anti-inflammatory mediators.³⁵

Acute HIIE also induced a significantly increase in CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg cells immediately and 1 hour

after bout in both low physical fitness and high physical fitness individuals. Acute mobilization of Treg cells is controversial in the literature, but there are some data indicating that high-intensity is necessary to increase the number of Treg cells after exercise. In this way, our results are in line with previous data who reported the better effects of HIIE on Treg mobilization after bout.^{7,36} Although these studies did not evaluate mTreg cells, the response of these cells seems to be also dependent of the exercise mode and intensity. Strenuous exercise, consisting in 4 day of 30 km of endurance exercise, did not alter CD4⁺CD45RA⁻FoxP3^{high} mTreg cells in elderly individuals.³⁷ However, a marathon running impacted on CD4⁺CD127⁻HLA⁻DR⁺CD45RO⁻ mTreg after 1 day of the bout.³⁸ Collectively, these results may indicate that very exhaustive, like ultra-marathon and marathon, induces a late increase in mTreg cells. On the contrary, well tolerated exercises (ie, HIIE) increase mTreg cells immediately after the bout. The mobilization of mTreg cells is a crucial for homeostasis of the immune system, while its deficiency may contribute to the autoimmune diseases, and higher amounts Treg cells can cause severe immunosuppression.

Physical inactivity lifestyle and obesity are associated with a proinflammatory condition and blunted Treg frequency.³⁹ On the contrary, the mobilization of mTreg cells by HIIE indicates an increased anti-inflammatory effect of this exercise mode. In fact, we previously demonstrated that HIIE increased the systemic levels of IL-10, an immunoregulatory cytokine secreted mainly by Treg cells, in both lean and obese sedentary individuals¹⁷. Thus, higher CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg cells until 1 hour after HIIE may explain the higher IL-10 levels reported in previous studies involving this type of exercise.

Recently, it was described that repeated adrenergic stimulation via β 2-adrenergic receptor increases the mobilization and the suppressive capacity of Treg cells.⁴⁰ In fact, CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg have higher immunosuppressive function through the conversion of ATP to adenosine by CD39 and CD73 ectoenzymes. Moritz et al³⁰ showed higher adenosine concentrations and increased ectonucleotidase activities after a single bout of exercise. Thus, the increase in systemic purinergic metabolism observed after exercise in healthy individuals may be involved in the anti-inflammatory effects of exercise through the activation of CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells. In this sense, increased ATP degradation and adenosine consumption by mTreg cells expressing CD39 were related to kidney transplantation tolerance, highlighting the immunosuppressive capacity of mTreg cells.⁴¹

We also report for the first time the impact of acute HIIE on CD4⁺CD25⁻CD73⁺ and CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells. Our results demonstrated a significantly mobilization of CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells in response to HIIE, returning

to the baseline values 1 hour after bout in both groups. No changes in CD4⁺CD25⁻CD73⁺ T cells in response to HIIE were observed. CD73 is a key molecule to induce immunoregulatory functions in T cells through the conversion of AMP into adenosine.⁸ Of note, the CD73-derived adenosine produced by Treg downregulates the nuclear factor- κ B activation in Teff cells, reducing the production of proinflammatory cytokines and chemokines.⁴²

The expression of CD73 on CD4⁺CD25⁻ T cells increase during acute inflammation through the stimulation of proinflammatory cytokines.⁴³ The lack of increase in the number of CD4⁺CD25⁻CD73⁺ T cells after the bout may be related to the control of inflammatory mediators after HIIE. Moreover, the expression of CD73 on the cell surface of CD4⁺CD25⁺ T cells is negligible, but abundant in the cytoplasm of cells.⁴⁴ In this way, acute exercise may stimulate the translocation of CD73 to cell surface on CD4⁺CD25⁺ T cells. In fact, we observed an increase in CD73 MFI immediately and 1 hour after HIIE in both groups. In addition, CD73 expression on mTreg cells is induced upon activation.⁴⁵ Collectively, our data demonstrate that HIIE has a prominent impact on both CD39 and CD73 expression (MFI) on CD4⁺CD25⁺ T cells. The increase in CD39 and CD73 expression on CD4⁺CD25⁺ T cells are necessary to the induction of immunosuppressive functions of Treg cells and to suppress IL-17 cytokine production.^{44,46} However, we failed to analyze the coexpression of both ectonucleotidases due to technical reasons.

5 | CONCLUSION

In conclusion, we provide first evidence that acute HIIE elicit a significant mobilization of CD4⁺ T cells expressing CD39 and CD73. The increase in ectonucleotidases expression on CD4⁺ T cells may explain, at least in part, some immunoregulatory and immunosuppressive effects of HIIE. Furthermore, high physical fitness individuals presented a differential redistribution of mTreg and mTeff cells compared with low physical fitness subjects in response to HIIE. Differences in the mobilization of CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells that express CD39 may be related to the immune adaptations due to a long-term physical training routine in physically active individuals.

ORCID

Gilson P. Dorneles  <http://orcid.org/0000-0001-6524-3204>

Alessandra Peres  <http://orcid.org/0000-0002-3587-2832>

Pedro R. T. Romão  <http://orcid.org/0000-0002-1039-2509>

REFERENCES

1. Rooney BV, Bigley AB, LaVoy EC, Laughlin M, Pedlar C, Simpson RJ. Lymphocytes and monocytes egress peripheral blood within minutes after cessation of steady state exercise: a detailed temporal analysis of leukocyte extravasation. *Physiol Behav.* 2018;194:260-267. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.06.008>
2. Campbell JP, Turner JE. Debunking the Myth of exercise-induced immune suppression: redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Front Immunol.* 9:648.
3. Brown FF, Bigley AB, Sherry C, et al. Training status and sex influence on senescent T-lymphocyte redistribution in response to acute maximal exercise. *Brain Behav Immun.* 2014;39:152-159.
4. Simpson RJ, Bigley AB, Agha N, Hanley PJ, Bollard CM. Mobilizing immune cells with exercise for cancer immunotherapy. *Exerc Sport Sci Rev.* 2017;45(3):163-172.
5. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the regulation of immune functions. *Prog in Mol Biol Transl Sci.* 2015;135:355-380.
6. Agha NH, Baker FL, Kunz HE, et al. Vigorous exercise mobilizes CD34⁺ hematopoietic stem cells to peripheral blood via the β 2-adrenergic receptor. *Brain Behav Immun.* 2018;68:66-75.
7. Krüger K, Alack K, Ringseis R, et al. Apoptosis of T-cell subsets after acute high-intensity interval exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2016;48(10):2021-2029.
8. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 2013;19:355-367.
9. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhi Y, et al. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol.* 2010;185:134-143. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803474>
10. Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res.* 2007;121(3):309-317.
11. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007;204:1257-1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
12. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant.* 2010;10:2410-2420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03291.x>
13. McRae JL, Chia JS, Pommey SA, Dwyer KM. Evaluation of CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection. *Nephrology.* 2017;22(7):505-512.
14. Souza DC, de Matos VAF, Santos VOA, et al. Effects of high-intensity interval and moderate-intensity continuous exercise on inflammatory, leptin, IgA, and lipid peroxidation responses in obese males. *Front Physiol.* 2018;9:567.
15. Dorneles GP, Haddad DO, Fagundes VO, et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine.* 2016;77:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.003>
16. Dorneles GP, da Silva IRV, Korb A, et al. High intensity interval exercise enhances the global HDAC activity in PBMC and anti-inflammatory cytokines of overweight-obese subjects. *Obes Med.* 2016;2:25-30. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2016.05.004>

17. Durrer C, Francois M, Neudorf H, Little JP. Acute high-intensity interval exercise reduces human monocyte toll-like receptor 2 expression in type 2 diabetes. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 2017;312(4):R529-R538.
18. Tossige-Gomes R, Costa KB, Ottone VO, Magalhães FC, Amorim FT, Rocha-Vieira E. Lymphocyte redox imbalance and reduced proliferation after a single session of high intensity interval exercise. *PLOS One*. 2016;11(4):1-18.
19. Balady GJ, Arena R, Sietsema K, et al. Clinician's guide to cardiopulmonary exercise testing in adults a scientific statement from the american heart association. *Circulation*. 2010;122(2):191-225.
20. Dorneles GP, Boeira MCR, Schipper LL, et al. Acute strenuous exercise induces an imbalance on histone H4 acetylation/histone deacetylase 2 and increases the proinflammatory profile of PBMC of obese individuals. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1-12.
21. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1521-1529. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.226>
22. Guzman-Flores JM, Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, et al. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology*. 2015;220:976-984. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.02.007>
23. Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol*. 2013;113(7):1839-1848.
24. Weinhold M, Shimabukuro-Vornhagen A, Franke A, et al. Physical exercise modulates the homeostasis of human regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1607-1610.
25. Mandapathil M, Lang S, Gorelik E, Whiteside TL. Isolation of functional human regulatory T cells (Treg) from the peripheral blood based on the CD39 expression. *J Immunol Methods*. 2009;346(1-2):55-63.
26. Cosentino M, Marino F, Maestroni GJM. Sympathoadrenergic modulation of hematopoiesis: a review of available evidence and of therapeutic perspectives. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:302. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00302>
27. Rhind SG, Shek PN, Shinkai S, Shephard RJ. Effects of moderate endurance exercise and training on in vitro lymphocyte proliferation, interleukin-2 (IL-2) production, and IL-2 receptor expression. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1996;74:348-360. <https://doi.org/10.1007/BF02226932>
28. Soricther S, Martin M, Julius P, et al. Effects of unaccustomed and accustomed exercise on the immune response in runners. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38:1739-1745. <https://doi.org/10.1249/01.mss.0000230213.62743.fb>
29. Martins CC, Bagatini MD, Cardoso AM, et al. Exercise training positively modulates the ectonucleotidase enzymes in lymphocytes of metabolic syndrome patients. *Int J Sports Med*. 2016;37(12):930-936.
30. Moritz CEJ, Teixeira BC, Rockenbach L, Reischak-Oliveira A, Casali EA, Battastini AMO. Altered extracellular ATP, ADP, and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Mol Cell Biochem*. 2017;426:55-63. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2880-1>
31. Coppola A, Coppola L, dalla Mora L, et al. Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *J Appl Physiol*. 2005;98:1414-1419. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00315.2004>
32. Graff RM, Kunz HE, Agha NH, et al. β_2 -Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8+ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. *Brain Behav Immun*. 2018;74:143-153. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.08.017>
33. Minuzzi LG, Rama L, Chupel MU, et al. Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2018;24:72-84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.043>
34. Steensberg A, Toft AD, Bruunsgaard H, Sandmand M, Halkjær-Kristensen J, Pedersen BK. Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *J Appl Physiol*. 2001;91(4):1708-1712.
35. Antunes BM, Campos EZ, Dos santos RVT, et al. Anti-inflammatory response to acute exercise is related with intensity and physical fitness. *J Cell Biochem*. 2018;24:72-84. <https://doi.org/10.1002/jcb.27810>
36. Wang J, Song H, Tang X, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sport*. 2012;22:643-652. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01288.x>
37. van der Geest KSM, Wang Q, Eijsvogels TMH, et al. Changes in peripheral immune cell numbers and functions in octogenarian walkers—an acute exercise study. *Immun Ageing*. 2017;14:5. <https://doi.org/10.1186/s12979-017-0087-2>
38. Clifford T, Wood MJ, Stocks P, Howatson G, Stevenson EJ, Hilken CMU. T-regulatory cells exhibit a biphasic response to prolonged endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*. 2017;117(8):1727-1737.
39. Bharath LP, Ip BC, Nikolajczyk BS. Adaptive immunity and metabolic health: harmony becomes dissonant in obesity and aging. *Compr Physiol*. 2017;7(4):1307-1337. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160042>
40. Dugger KJ, Chrisman T, Sayner SL, Chastain P, Watson K, Estes R. β_2 Adrenergic receptors increase TREG cell suppression in an OVA-induced allergic asthma mouse model when mice are moderate aerobically exercised. *BMC Immunol*. 2018;19(1):1-13.
41. Durand M, Dubois F, Dejou C, et al. Increased degradation of ATP is driven by memory regulatory T cells in kidney transplantation tolerance. *Kidney Int*. 2018;93:1154-1164. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.12.004>
42. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells. *AJP Cell Physiol*. 2011;301:C530-C539. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00385.2010>
43. Bono MR, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: beyond immunosuppression. *FEBS Lett*. 2015;589:3454-3460. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.07.027>
44. Mandapathil M, Hildorfer B, Szczepanski MJ, et al. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T Cells. *J Biol Chem*. 2010;285:7176-7186. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.047423>

45. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, et al. Human CD4+CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol*. 2014;177:531-543. <https://doi.org/10.1111/cei.12354>
46. Magid-Bernstein JR, Rohowsky-Kochan CM. Human CD39⁺ T_{reg} cells express Th17-associated surface markers and suppress IL-17 via a Stat3-dependent mechanism. *J Interf Cytokine Res*. 2017;37(4):153-164.

How to cite this article: Dorneles GP, da Silva IM, Peres A, Romão PRT. Physical fitness modulates the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ CD25⁻ and CD4⁺ CD25⁺ T cells following high intensity interval exercise. *J Cell Biochem*. 2019;1-11. <https://doi.org/10.1002/jcb.28364>

6. CAPÍTULO IV

6.1 ARTIGO ORIGINAL – The impact of cardiorespiratory fitness on the inflammatory profile of obese men: effects in CD39 and CD73 on CD4+ T cells, regulatory T cells and monocyte subsets

The impact of cardiorespiratory fitness on the inflammatory profile of obese men: effects in CD39 and CD73 on CD4+ T cells, regulatory T cells and monocyte subsets

Gilson P Dorneles^{1,2*}, Igor da Silva¹, Maria Carolina Boeira^{1,3}, Diandra Valentini¹, Simone Gonçalves Fonseca⁴, Pedro Dal Lago⁵, Alessandra Peres^{1,3,5}, Pedro R T Romão^{1,2,6*}

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, ²Graduate Program in Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

³Research Center, Methodist University Center IPA, 90420-060 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Institute of Tropical Pathology and Public Health, Universidade Federal de Goiás, 74605-450 Goiânia, GO, Brazil

⁵Graduate Program in Rehabilitation Sciences, ⁶Graduate Program in Biosciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

Running Ahead Title: Cardiorespiratory fitness and immune system

*Corresponding authors:

Pedro R.T. Romão and Gilson P Dorneles. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. UFCSPA. Rua Sarmiento Leite, 245. 90050-170. Porto Alegre - RS, Brasil. Phone++55(51)33039000.

E-mail addresses: pedror@ufcspa.edu.br (P.R.T. Romão); gilsonpd@ufcspa.edu.br (G.P. Dorneles)

Submetido na revista *Metabolism – Clinical and Experimental*

Fator de Impacto: 5.963

Abstract

Background/Aim Chronic inflammation and accumulation of senescent T cells underlies many of unhealthy markers associated with obesity and low cardiorespiratory fitness (CRF). Although exercise training induces anti-inflammatory effects without changes in fat mass, the role of CRF on cellular immunity of obese subjects is unknown. This study aimed to verify the peripheral frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg cells, CD39 and CD73 on CD4⁺ T cells, monocyte subsets and the systemic levels of cytokines in lean and obese men with different levels of CRF.

Methods Blood samples were obtained from 45 lean and 45 obese men who were assigned into six groups according to body mass index (BMI) and CRF (low, moderate or high peak of oxygen consumption, VO_{2Peak}). Moreover, seven obese men with low VO_{2Peak} performed one week of High Intensity Interval Training (HIIT, 3 sessions/week) and blood samples were collected before and 24 h after the last session. In blood samples were analyzed the frequency of monocyte subsets, CD4⁺, CD8⁺, HLA-DR⁺ and CCR5⁺ T cells, and subpopulations of CD4⁺ T cells (Treg cells, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}; mTeff, CD4⁺CD25⁺CD39⁺; mTreg, CD4⁺CD25⁺CD39⁺). The systemic levels of interleukin (IL)-6, IL-10, IL-17a, IL-33, leptin and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were also evaluated.

Results Higher CRF status modulates the obesity-associated alterations in Treg cells, the frequency of CD4⁺CD25⁺CD39⁺ and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ T cells and the percentage of intermediate and non-classical monocytes. In general, we observed an imbalance between proinflammatory-immunoregulatory cytokines according to CRF, with an augment in IL-6 and TNF- α and a decrease in IL-10 and IL-33 concentrations in obese individuals with low VO_{2Peak}. HIIT increased the proportions of circulating mTreg and Treg cells in sedentary obese individuals.

Conclusions CRF has immunoregulatory properties in lean and obese men, contributing to the maintenance of lower inflammatory mediators levels.

Key words: VO₂peak; exercise; obesity; T cells; Treg cells; CD39; CD73; monocyte subsets; inflammation.

1. INTRODUCTION

Obesity is a global public health concern and is recognized as one of the main risk for the development of cardiometabolic diseases, certain types of cancer and premature death (2). The chronic low-grade inflammation, a 2-3 fold elevation in systemic inflammatory mediators, are linked to obesity due to the pathological expansion of the adipose tissue and immunometabolic disturbances (4). Increased plasma levels of tumor necrosis alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) are related to the higher frequencies of intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14⁻CD16⁺), which contribute to the insulin resistance in the peripheral circulation of obese individuals (5,214).

In recent years, the impact of obesity on the adaptive immune response has been better investigated. Obesity accelerates the thymic involution, inducing an early accumulation of exhausted memory T cells and an imbalance of T helper type 1 (Th1) and Th2 cells (59,215). Moreover, the proportion of regulatory T (Treg) cells is reduced into adipose tissue as well as in the peripheral circulation of obese compared to lean individuals (7,77). Treg cells are a subset of CD4⁺ T cells whose main function is to suppress the immune response and to maintain the self-tolerance (216). The phenotype of Treg cells are defined by the intracellular expression of transcription factor Foxp3 (Forkhead box protein P3), which is the master regulator for their development and function (217), and high expression of IL-2 receptor- α chain (CD25) (218). The expression of CD127 on the cell surface of CD4⁺CD25^{high} T cells inversely correlates with FoxP3, and the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} was accepted for identification of circulating Treg cells in humans (219). Moreover, a healthy immune balance is maintained by Treg cells through the suppression of the function and activity of many immune effector cells, including CD8⁺ T cells, NK cells, dendritic and monocytes/macrophages, and the secretion of immunoregulatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β (218).

The purinergic system influences many activities and functions of immune cells, such as cell-to-cell interactions, activation and proliferation of T lymphocytes, cytokine and chemokine secretion, surface antigen shedding and intracellular pathogen removal (81). The hydrolyses of ATP and ADP (adenosine diphosphate) into AMP (adenosine monophosphate) is mediated by the cell surface-located enzyme ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39), whereas ecto-5'-nucleotidase (CD73) further converts AMP to adenosine which are carried by specific receptors on the cell surface of several T cells subsets (87). Moreover, in humans the co-expression of CD39 and CD25 on CD4⁺ T cells surface has been used to identify distinct T cell populations: CD4⁺CD25[–]CD39⁺ (memory T effector cell, mTeff) and CD4⁺CD25⁺CD39⁺ (activated/memory Treg, mTreg) (84). In obesity, the imbalance between CD39 and CD73 in T cells was related to unhealthy metabolic markers (100,101).

A sedentary lifestyle contributes to a chronic low-grade inflammation, as viewed by high levels of inflammatory cytokines and the accumulation of memory T cells in peripheral blood of inactive individuals(15,203). Conversely, the frequency of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells inversely correlate with cardiorespiratory fitness (CRF), which is mainly indicative of an active lifestyle, in 102 men (aging between 18 to 61 years) [19]. The peak of oxygen consumption (VO_{2Peak}) is a gold standard measure of CRF that is modulated with the degree of physical inactivity/activity and is associated with risk of morbidity, mortality and quality of life in obese individuals (196).

The CRF also impacts on the frequency of Treg cells and the production of IL-10 in healthy individuals (16). In a cohort of 245 elite Olympic athletes, it was showed that the VO_{2Peak} strongly correlates with the frequency of Treg cells (200). So far, no study was carried out to evaluate the impact of CRF in the peripheral frequency of T cell phenotypes in obese individuals with different VO_{2Peak} values. Therefore, this study was conducted to

evaluate cytokine concentrations, the frequency of CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg cells, the frequencies of CD39 and CD73 on CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells, and the expression of HLA-DR and CCR5 on T cells, and frequencies of monocyte subsets of lean and obese individuals with different levels of CRF.

2. METHODS

2.1 Ethics Statement

This cross sectional study was approved by the Ethic's Research Committee of the UFCSPA (63282416.6.0000.5345) and all experimental procedures were performed according to the declaration of Helsinki. All participants were informed about the study and signed the informed consent.

2.2 Participants and groups design

The sample size was calculated in G Power (version 3.1.3, Germany) that indicated that a total of 90 men would be enough to detect differences in T cell phenotypes with a power of 85% and 5% significance level. Initially, men were assigned into two experimental groups according to their body mass index (BMI): lean group (n=45) and obese group (n=45). The individuals were healthy, age ranging from 20 to 40 years, and free of illness and injury. All participants were nonsmokers, reported weight stable (± 2 kg for ≥ 3 months), had normocaloric diet and not taking any medications or supplements known to affect metabolic or immune systems in the last 6 months. Normocaloric diet was defined as the intake of the 90-100% of energy expenditure of each participant, and verified through a 24 h diet recall (data not show). The 24 h diet recall interview was performed by a nutritionist to record the amount of food and beverage consumed during 24 h before the main trial. Exclusion criteria included excessive alcohol intake (>10 drinks/week), autoimmune or cardiac diseases, or type 1 and type 2 diabetes, acute and chronic infections. Individuals who presented very low VO_{2Peak} (<25.30 mL.kg.min) or high values of VO_{2Peak} (>58.8 mL.kg.min) were also excluded.

After inclusion in the study, subjects completed a medical questionnaire, a comprehensive behavior survey/questionnaire and the International Physical Activity Questionnaire-IPAQ (<https://sites.google.com/site/theipaq/>). Participants who were regular exercisers were recruited mainly from runners associations and sports clubs. Forty

participants were non-exercisers (15 lean and 20 obese individuals); 30 who moderately trained, i.e. who practiced 2-3 times/week collective sports or running (less than 5 km/training) (20 lean and 15 obese individuals); and 20 who intensely trained, i.e. who practiced 4-5 times/week collective sports or running (more than 6 km/training) (10 lean and 10 obese individuals).

All volunteers were categorized into six groups according to their CRF status/self-reported physical activity behavior and BMI. This CRF classification criteria used took into account the age of the participants and was based on Herdy and Caixeta [23], which determined the Brazilian cardiorespiratory fitness based on VO_{2Peak} .

2.3 Study design

This study was divided into two parts. The first experimental trial was designed in a cross-sectional form to evaluate the impact of CRF on the subsets of monocyte and phenotype of T cells (mainly the expression of CD39 and CD73 on CD4⁺ T cells and Treg cells) and the systemic cytokine levels in obese and lean individuals. After, a pilot experiment trial was conducted with 7 obese sedentary men with low VO_{2Peak} with to verify the effect of one week of high intensity interval training (HIIT) on the peripheral frequency of Treg cells, and the expression CD39 and CD73 on CD4⁺CD25⁺ T cells in seven sedentary obese men. Figure 1 shows the experimental design of our study.

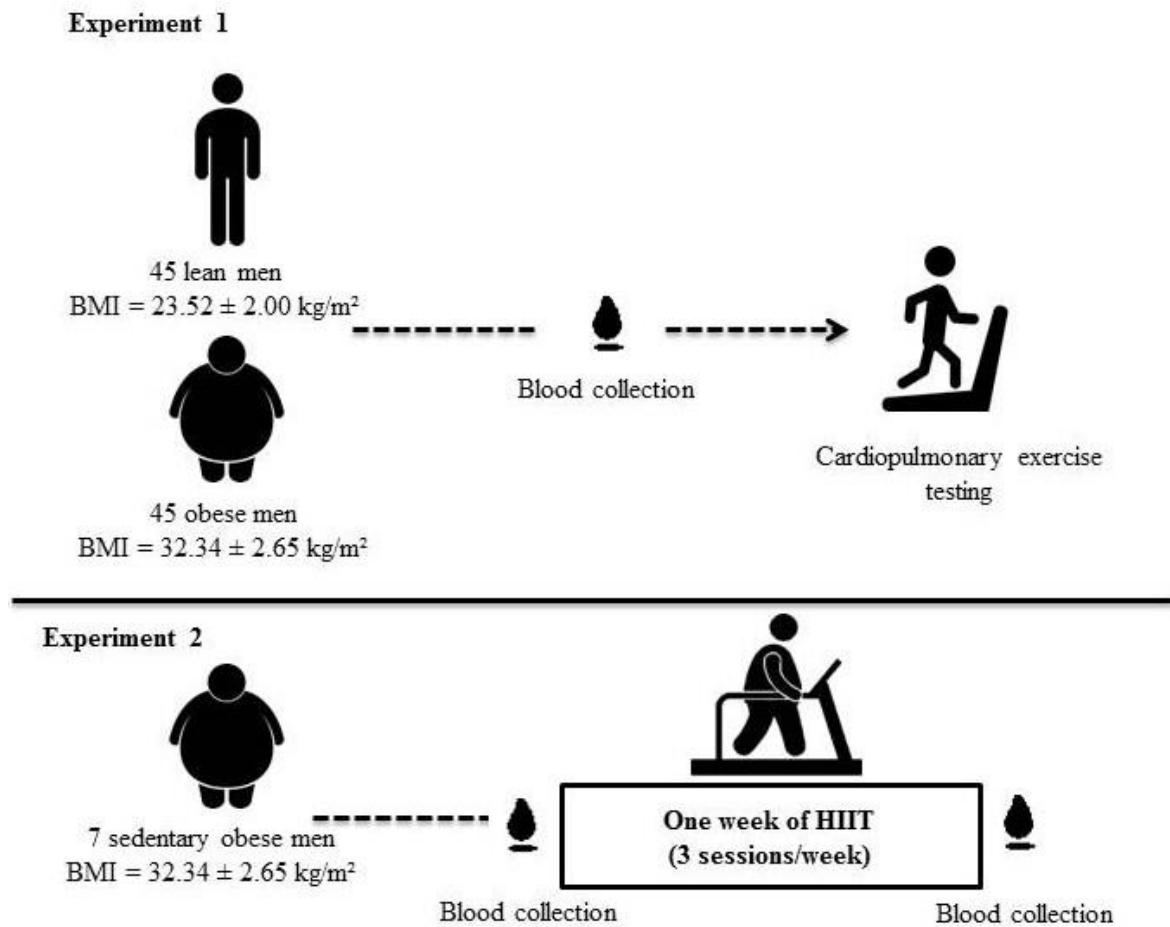


Figure 1. Experimental design of the study.

In experiment 1, a fasting blood sample was collected from 45 lean and 45 obese men to evaluate the monocyte subsets, T cell phenotypes and systemic cytokine levels. After, all individuals underwent to a cardiopulmonary exercise testing to identify their CRF. In experiment two, 7 sedentary obese men were submitted to one week of High Intensity Interval Training (HIIT, 3 sessions/week) with blood collection before and 24 h after the last session to evaluate the peripheral frequency of Treg cells and the frequencies of CD39 and CD73 on CD4+CD25+ T cells.

2.4 Preliminary measurements

One week before the Experiment 1, subjects reported to the Cellular and Molecular Immunology Lab (UFCSPA, Porto Alegre/Brazil), after an overnight fast, to blood collection and anthropometric evaluations.

A fasting blood sample (4 mL) was collected into tubes without anticoagulant (BD, EUA), centrifuged (1500g), serum was aliquoted, and frozen at -20°C to determine the metabolic profile (glucose and lipid profile). All evaluations were performed three times and the average was used for analysis. Body mass (kg) and height (meters) were determined by a semi-analytical scale with a stadiometer attached (Welmy, Santa Barbara D'Oeste, Brazil). Waist (WC, cm), abdomen (AC, cm), and hip (HC, cm) circumferences were measured through an inelastic measuring tape. BMI (kg/m^2) was defined as body mass (kg) divided by the square of height (m^2). Body fat percent was determined by the Jackson & Pollock formula and later converted to fat percentage (221).

2.5 Experiment 1

After the preliminary visit, all subjects arrived at the Cellular and Molecular Immunology Laboratory (UFCSPA, Porto Alegre/Brazil) at the day of testing in the fasted state. Volunteers were asked to refrain from strenuous physical activity, caffeine and alcohol consumption for 48 h before test. The participants remained at rest during 5 minutes and a rest blood sample was taken from the antecubital vein using sterile vacutainer tubes (15 mL into K3EDTA tube) (Becton Dickinson (BD) Juiz de Fora, MG, Brazil).

The cardiopulmonary exercise testing (CPX) was performed on an electric treadmill (Centurion 300, Micromed, Brazil) using a ramp protocol as described before (214). The laboratory temperature control ($18-22^{\circ}\text{C}$) and relative humidity (40-60 %) was continuously monitored. Briefly, exercise test started at 4.5 km/h and no slope for all study participants. Then, the load (speed and slope) was individually increased for each participant considering

their physical condition and tolerance. The test was terminated after verification of at least two of the following circumstances: a) request of the participant due to extreme tiredness and/or perception of the intense dyspnea; b) reached the maximum heart rate (HR) predicted by age (HR_{max}) was $\geq 85\%$; c) peak respiratory exchange ratio $RER > 1.1$; d) VO_2 plateau was reached even with increasing workload (196).

Ventilatory and metabolic parameters were collected by respiration using Metalyzer 3B (Cortex, Germany) and were analyzed after the mean of the data in 8 respiratory cycles. The CPX system was calibrated before each test concerning both airflow and O_2 and CO_2 analyzers. The average of the last test 30 s was used to determine the VO_{2peak} .

2.6 One week of HIIT

To verify the impact of a short-term exercise training on the frequency of CD4+CD25+ T cells expressing CD39 or CD73 and also on CD4+CD25^{high}CD127^{low} T cells, seven obese 7 individuals ($BMI\ 33.24 \pm 2.94\ kg/m^2$; low $VO_{2Peak}\ 34.54 \pm 3.27\ ml.kg.min$) performed a one week of HIIT in electrical treadmill. Blood samples were collected before the first exercise session and 24 h after the last session. High intensity interval exercise (HIIE) was based on our previous study taken into account the HR_{Max} achieved in CPX (181). Briefly, after an initial warm-up (5 min, 50% of HR_{Max}) 10 bouts of 60 s (85–90% HR_{Max}) alternated with 75 s of recovery (50% HR_{Max}) were performed followed by 5 min of cool-down (50% HR_{Max}). The participants performed 3 sessions of HIIE with 48 h of recovery between sessions.

2.7 Lipid and glycemic evaluation

Fasting concentrations of glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), and triglycerides were determined in the serum by standard clinical laboratory methods, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory

Standards Institute (CLSI) guidelines in an automated biochemical machine (BS120, BioClin, Brazil).

2.8 Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation

PBMC of lean and obese individuals were isolated from the peripheral blood using Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) as described before (214). Plasma was collected and frozen at -20°C for cytokines analysis as described below. PBMC viability was determined by trypan blue exclusion and the viability was always >95%. Then, the cells were washed and suspended in Roswell Park Memorial Institute-1640 medium (RPMI-1640, Sigma-Aldrich) supplemented with 2 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich), 2% glutamine, and 100 U/mL penicillin–0.1 mg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich).

2.9 Cell staining and flow cytometry

The peripheral frequencies of T cells and monocyte subsets were determined in freshly isolated PBMCs of lean and obese individuals at rest. The same procedures were made before and 24 h after the short-term HIIT in sedentary obese individuals. Briefly, 2×10^5 PBMCs/mL washed in flow cytometry buffer [Phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% FBS] and 0.01% sodium azide) and treated with Fc Block solution for 20 min. Cells were stained for 30 min at 4°C with monoclonal antibodies conjugated with specific fluorochromes: anti-human CD14 FITC (BIOGEMS, EUA), anti-human CD3/CD8 FITC/PE cocktail, anti-human CD4 FITC, anti-human CD25 PE, anti-human CD127 PerCP-Cyanine5.5 (all from Ebioscience, USA); anti-human HLA-DR PE, anti-human CD195 (CCR5) FITC, anti-human CD4 PerCP-Cy5.5, anti-human CD16 PE, anti-human CD25 FITC, anti-human CD39 PE, anti-human CD73 PE (all from BD Bioscience, USA). After 15 min of incubation, cells were suspended in 0.4 mL bovine serum albumin (BSA) 1% in PBS and analyzed by flow cytometry. Cell phenotype was acquired using CELLQuest Pro Software (BD Bioscience, USA) on a

FACSCalibur flow cytometer (BD Bioscience, USA). Lymphocytes and monocytes were identified and gated according to each forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) profiles. In lymphocyte gate, the peripheral frequency of CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺CCR5⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺CD39⁺, CD4⁺CD25⁺CD73⁺, CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} were evaluated. In monocyte gate, the peripheral frequencies of CD14⁺CD16⁻ (classical), CD14⁺CD16⁺ (intermediate) and CD14⁺CD16⁺ (non-classical) monocytes were analyzed. Single color control tubes were used in each assay to account for spectral overlap. A minimal of 30.000 events per tube was acquired for analysis.

2.10 Cytokines and leptin analysis

The plasma concentrations of leptin, IL-33, IL-17a (all from PeproTech, USA), and TNF- α , IL-6 and IL-10 (all from eBioscience, USA), were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microplate reader (EzReader, EUA). The detection limits of each cytokine was: TNF- α , 4 – 500 pg/mL, IL-6, 2 - 200 pg/mL; IL-10, 2 - 300 pg/mL; IL-17a, 6 - 1000 pg/mL; IL-33, 32 - 4000 pg/mL; leptin, 6 - 400 pg/mL.

2.11 Statistical analysis

Normality of data was checked by Kolmogorov-Smirnov, and the values were presented as mean $\pm$ standard deviation (SD). Anthropometric characteristics, CRF, biochemical analysis and immune variables were compared between groups through a one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc for multiple comparisons. The short-term immune response to HIIT in obese sedentary individuals was evaluated by paired Student t-test. P values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The SPSS 20.0 (IBM Inc., EUA) software was used in all analysis.

3. RESULTS

3.1 Anthropometric characteristics, CRF status and biochemical data of the participants

Initially, 160 individuals were recruited for this study. 70 individuals were excluded by the following reasons: 20 obese and 10 lean individuals reported a hypocaloric diet; 15 lean individuals had CRF higher than 58.8 mL.kg.min and 10 obese men had very low $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ (25.30 mL.kg.min); 15 obese individuals presented fasting glucose levels higher than 130 mg/dL.

Table 1 shows the anthropometric characteristics and biochemical data of lean and obese individuals with different CRF status. All individuals of lean groups (low, moderate and high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$) presented lower body mass, BMI, WC, AC, HC, WHR and body fat ($p < 0.001$ for all parameters) than obese individuals, independently of their CRF. $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ and fitness status (METs) were different between all groups ($p < 0.01$), except in lean moderate $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ vs. obese moderate $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ comparison ($p > 0.05$). To confirm the differences of $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ among groups, we relativize the absolute $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ values to free fat mass (FFM), once that adipose tissue has minimal impact on energy expenditure during a graded test. In this way, the differences between groups remained after FFM-related data ($p < 0.01$).

The biochemical data demonstrated that obese individuals with low $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ had higher fasting glucose than lean individuals with low, moderate or high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ ($p < 0.001$ for all) and obese individuals with high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ ($p = 0.03$). Also, obese individuals with low $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ had higher triglycerides ($p = 0.006$) and total cholesterol ($p = 0.03$) and lower HDL ($p < 0.001$) than lean individuals with high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$. Differences were also found in total cholesterol ($p = 0.05$) and HDL ($p = 0.01$) in obese low $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ vs. obese high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$. On the other hand, lean individuals with high $\text{VO}_{2\text{Peak}}$ had higher HDL levels than lean subjects with low ($p = 0.02$) and moderate ($p = 0.04$) $\text{VO}_{2\text{Peak}}$.

Table 1. Anthropometric characteristics and biochemical data of lean and obese individuals with different CRF status

	Lean			Obese		
	Low VO _{2Peak}	Mod VO _{2Peak}	High VO _{2Peak}	Low VO _{2Peak}	Mod VO _{2Peak}	High VO _{2Peak}
VO _{2Peak} (mL.kg.min)	37.8 ± 1.4 ^{b,c}	44.6 ± 2.2 ^c	54.4 ± 4.1	33.6 ± 4.2 ^{a,b,c,e}	42.4 ± 2.1 ^{a,c,d,e}	49.9 ± 2.6 ^{a,b,c}
VO _{2Peak} (mL.kgFFM.min)	48.0 ± 3.0 ^{b,c}	55.8 ± 3.0 ^c	62.1 ± 4.6	44.3 ± 6.05 ^{a,b,c,e}	51.1 ± 4.1 ^{a,c,d,e}	57.3 ± 5.2 ^{a,b,c}
METs (min/week)	759.1 ± 127.2 ^{b,c}	1828.3 ± 319.2 ^c	3617 ± 753	539.1 ± 278.1 ^{a,b,c,e}	1267.1 ± 478.1 ^{a,c,d,e}	2812 ± 812 ^{a,b,c}
Age (y)	34.2 ± 3.4	33.3 ± 2.6	34.5 ± 2.8	33.3 ± 2.4	34.9 ± 5.6	33.6 ± 3.0
Height (m)	1.76 ± 0.05	1.75 ± 0.05	1.75 ± 0.05	1.73 ± 0.05	1.74 ± 0.04	1.76 ± 0.04
Body mass (kg)	72.2 ± 9.4	72.8 ± 6.8	72.8 ± 4.0	98.0 ± 6.9 ^{a,b,c}	99.2 ± 5.8 ^{a,b,c}	95.8 ± 6.9 ^{a,b,c}
BMI (kg/m ²)	23.3 ± 2.7	23.5 ± 1.5	23.7 ± 1.3	32.6 ± 2.2 ^{a,b,c}	32.7 ± 1.5 ^{a,b,c}	31.9 ± 1.4 ^{a,b,c}
Fat mass (%)	20.8 ± 3.5	20.9 ± 3.1	18.7 ± 2.3	34.5 ± 3.0 ^{a,b,c}	34.7 ± 3.1 ^{a,b,c}	32.0 ± 4.0 ^{a,b,c}
WC (cm)	81.5 ± 7.3	80.8 ± 4.6	78.0 ± 5.0	97.9 ± 5.6 ^{a,b,c}	100.6 ± 2.9 ^{a,b,c}	96.8 ± 2.4 ^{a,b,c}
AC (cm)	83.8 ± 7.4	80.4 ± 7.9	76.6 ± 3.4	103.6 ± 7.7 ^{a,b,c}	104.9 ± 3.8 ^{a,b,c}	101.0 ± 2.5 ^{a,b,c}
Glucose (mg/dL)	90.2 ± 8.6	86.3 ± 20.3	88.1 ± 16.6	120.7 ± 10.9 ^{a,b,c,e}	94.7 ± 24.6	86.6 ± 19.7
Tryglicerides (mg/dL)	146.2 ± 49.6	145.0 ± 49.5	115.66 ± 48.2	182.2 ± 59.7 ^c	148.2 ± 45.2	126.2 ± 41.0
TC (mg/dL)	173.0 ± 37.7	164.4 ± 44.3	150.1 ± 43.1	203.7 ± 46.8 ^{c,e}	185.0 ± 34.5	151.3 ± 69.2
HDL (mg/dL)	43.3 ± 6.5	43.5 ± 12.1	54.4 ± 11.2 ^{a,b}	36.7 ± 9.0 ^{c,e}	47.1 ± 6.5	52.0 ± 11.8
LDL (mg/dL)	116.7 ± 23.7	98.1 ± 15.6	94.5 ± 21.6	128.0 ± 33.9	115.8 ± 33.3	109.3 ± 53.9

Data are expressed as mean ± standard deviation. BMI, body mass. index; FM, fat mass; WC, waist circumference; AC, abdominal circumference; FFM, Free Fat mass; VO_{2Peak}, Peak of Oxygen consumption; METs, metabolic equivalents; TC, total cholesterol; HDL, High density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; Mod, moderate.

^a Denotes significant difference compared to lean low VO_{2Peak} (p<0.05).

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO_{2Peak} (p<0.05).

^c Denotes significant difference compared to lean high VO_{2Peak} (p<0.05).

^d Denotes significant difference compared to obese low VO_{2Peak} (p<0.05).

^e Denotes significant difference compared to obese high VO_{2Peak} (p<0.05).

3.2 Cytokine and leptin plasma levels

The systemic levels of inflammatory (IL-6, IL-17a and TNF- α), immunoregulatory (IL-10 and IL-33) cytokines and leptin are presented in Table 2. As expected, leptin levels were higher in all obese groups compared to lean groups ($p < 0.001$ for all), independently of the CRF status. Obese individuals with low VO_{2Peak} presented higher IL-6 levels compared to lean with moderate ($p = 0.003$) and high ($p = 0.006$) VO_{2Peak} ($p = 0.003$), and obese with high VO_{2Peak} ($p = 0.021$). Furthermore, obese individuals with low VO_{2Peak} presented higher TNF- α and lower IL-10 and IL-33 levels than lean individuals with low ($p = 0.01$; $p < 0.001$; $p = 0.02$, respectively), moderate ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$, respectively) or high VO_{2Peak} ($p < 0.001$; $p < 0.001$; $p < 0.001$ respectively), and obese with moderate ($p = 0.01$; $p < 0.001$; $p = 0.002$, respectively) and high VO_{2Peak} ($p < 0.001$; $p = 0.01$; $p < 0.001$, respectively). Higher levels of TNF- α and lower IL-10 and IL-33 concentrations were also found in lean with low VO_{2Peak} compared to lean with moderate ($p = 0.05$; $p < 0.001$; $p = 0.007$, respectively) and high CRF ($p = 0.01$; $p = 0.01$; $p < 0.001$, respectively). Similarly, obese individuals with moderate and high VO_{2Peak} had lower IL-10 and IL-33 and higher TNF- α compared to lean participants with high CRF ($p < 0.001$ for all); and obese group with moderate VO_{2Peak} had low IL-10 levels than the lean group with moderate VO_{2Peak} ($p = 0.02$). Finally, lean individuals with high VO_{2Peak} had higher IL-10 and IL-33 than lean with moderate CRF ($p = 0.002$; $p < 0.001$, respectively).

Table 2. Systemic levels of cytokines and leptin of lean and obese individuals with different of CRF status

	Lean			Obese		
	Low VO _{2Peak}	Mod VO _{2Peak}	High VO _{2Peak}	Low VO _{2Peak}	Mod VO _{2Peak}	High VO _{2Peak}
IL-6 (pg/mL)	4.9 ± 1.0	3.8 ± 1.4	4.1 ± 2.9	7.6 ± 4.4 ^{b, c, e}	5.8 ± 2.4	4.3 ± 1.4
IL-10 (pg/mL)	17.4 ± 3.8 ^{b, c}	25.9 ± 4.0 ^c	32.7 ± 7.5	10.4 ± 3.5 ^{a, b, c, e}	20.5 ± 2.9 ^{b, c, d}	22.7 ± 3.7 ^{a, c}
IL-17a (pg/mL)	14.6 ± 2.3	13.9 ± 4.6	13.3 ± 1.7	15.7 ± 2.9	14.2 ± 2.0	14.8 ± 4.3
IL-33 (pg/mL)	179.7 ± 16.5 ^{b, c}	222.2 ± 34.9 ^c	275.3 ± 57.4	143.2 ± 21.5 ^{a, b, c, e}	188.9 ± 24.4 ^{c, d}	214.5 ± 19.5 ^c
Leptin (pg/mL)	15.8 ± 3.2	13.9 ± 2.5	12.0 ± 1.7	52.4 ± 14.5 ^{a, b, c}	46.1 ± 12.3 ^{a, b, c}	44.0 ± 7.6 ^{a, b, c}
TNF-α (pg/mL)	22.9 ± 5.9 ^{b, c}	14.0 ± 1.3	9.5 ± 2.1	38.3 ± 17.4 ^{a, b, c, e}	21.2 ± 5.4 ^{c, d}	20.7 ± 3.8 ^c

Data are expressed as mean ± standard deviation.

IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor-α; VO_{2Peak}, peak of oxygen consumption; Mod, moderate.

^a Denotes significant difference compared to lean low VO_{2Peak} (p<0.05).

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO_{2Peak} (p<0.05).

^c Denotes significant difference compared to lean high VO_{2Peak} (p<0.05).

^d Denotes significant difference compared to obese low VO_{2Peak} (p<0.05).

^e Denotes significant difference compared to obese high VO_{2Peak} (p<0.05).

3.3 Impact of CRF on CD4+ and CD8+ T cell subsets

Obese individuals with low VO_{2Peak} had lower CD3+CD8+ T cells than lean low (p=0.01), moderate (p=0.05) and high VO_{2Peak} (p=0.001) groups (Table 3). However, no differences were found in CD3+CD8+ T cells in both obese moderate VO_{2Peak} and obese high VO_{2Peak} groups compared to lean individuals, independently of the CRF status (p>0.05). No differences were identified in peripheral frequency of CD3+CD4+ (p>0.05) and CD3+CCR5+ T cells (p>0.05) among groups. A difference was found in CD4:CD8 ratio between lean high VO_{2Peak} and obese low VO_{2Peak} (p=0.028). The peripheral frequency of CD3+HLA-DR+ T cells was higher in lean low VO_{2Peak} than those found in lean high VO_{2Peak} (p<0.001) and obese high VO_{2Peak} (p=0.03) groups. Obese low VO_{2Peak} group had higher frequency of CD3+HLA-DR+ T cells than lean with low (p<0.001), moderate (p<0.001) or high VO_{2Peak}

($p<0.001$), and obese with moderate ($p<0.001$) and high VO_{2Peak} ($p<0.001$) groups. Finally, lean high VO_{2Peak} had lower CD3+HLA-DR+ T cells than obese moderate VO_{2Peak} ($p=0.001$).

Table 3. Peripheral frequency of CD4+ and CD8+ T cells and activation immune markers in CD3+ T cells of lean and obese individuals with different levels of CRF

	Lean			Obese		
	Low VO_{2Peak}	Mod VO_{2Peak}	High VO_{2Peak}	Low VO_{2Peak}	Mod VO_{2Peak}	High VO_{2Peak}
CD3+CD4+ (%)	45.3 $\pm$ 5.6	43.6 $\pm$ 11.7	40.5 $\pm$ 5.2	41.4 $\pm$ 7.3	42.0 $\pm$ 4.5	40.4 $\pm$ 7.3
CD3+CD8+ (%)	24.1 $\pm$ 4.0	23.2 $\pm$ 5.2	25.4 $\pm$ 5.6	18.0 $\pm$ 5.8 ^{a,b,c}	21.6 $\pm$ 3.1	22.1 $\pm$ 5.0
CD4:CD8 ratio	1.9 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.1 ^c	1.9 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3
CD3+HLA-DR+ (%)	11.9 $\pm$ 5.7 ^{c,e}	7.8 $\pm$ 3.3	3.5 $\pm$ 1.5	19.3 $\pm$ 6.3 ^{a,b,c}	10.4 $\pm$ 4.2 ^{c,d}	6.6 $\pm$ 1.8 ^d
CD3+CCR5+ (%)	7.9 $\pm$ 4.1	6.7 $\pm$ 4.1	10.6 $\pm$ 5.3	10.6 $\pm$ 4.8	10.0 $\pm$ 7.9	9.6 $\pm$ 6.0

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

VO_{2Peak} , peak of oxygen consumption; Mod, moderate.

^a Denotes significant difference compared to lean low VO_{2Peak} ($p<0.05$).

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO_{2Peak} ($p<0.05$).

^c Denotes significant difference compared to lean high VO_{2Peak} ($p<0.05$).

^d Denotes significant difference compared to obese low VO_{2Peak} ($p<0.05$).

^e Denotes significant difference compared to obese high VO_{2Peak} ($p<0.05$).

3.4 Impact of CRF on CD4+CD25+ and the frequencies of CD39 and CD73 on CD4+CD25 T cells

Figure 2 shows the peripheral frequency of CD4+CD25+ T cells (Fig.2A), CD4+CD25-CD39+ mTeff (Fig.2B), CD4+CD25-CD73+ T cells (Fig.2C) in lean and obese individuals with different levels of CRF. Obese individuals with low VO_{2Peak} had higher proportions of mTeff cells than lean with moderate ($p=0.02$) or high VO_{2Peak} ($p<0.001$), and obese with high VO_{2Peak} ($p<0.001$). Moreover, obese with moderate VO_{2Peak} presented lower frequency of mTeff cells in relation to obese with low VO_{2Peak} ($p=0.05$) and higher frequency in relation to lean with high VO_{2Peak} ($p=0.045$) (Fig.2B).

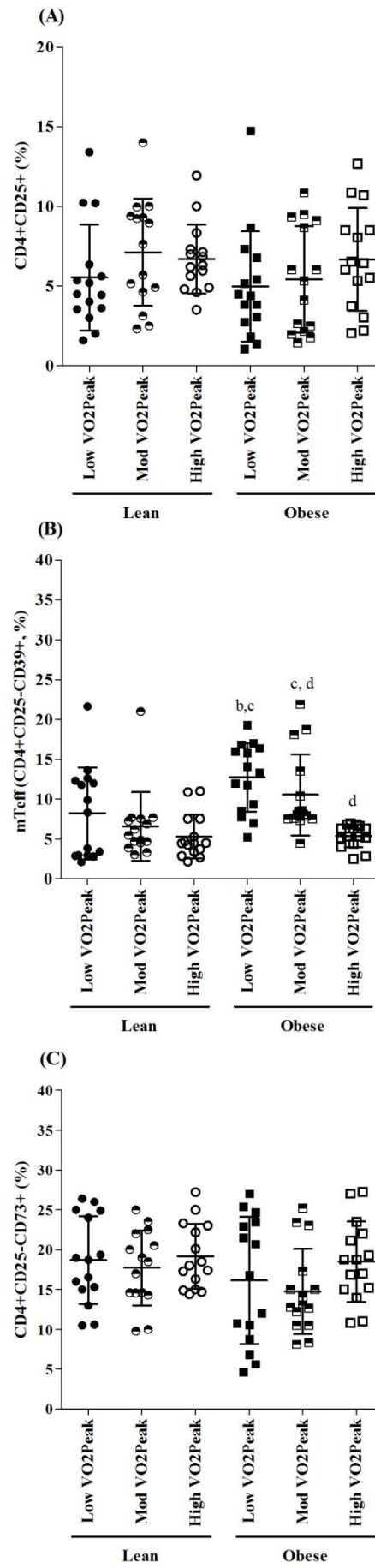


Figure 2. Peripheral frequency of CD4+CD25⁺ (1A) and CD4+CD25-CD39⁺ (1B) and CD4+CD25-CD73⁺ T cells (1C) of lean and obese individuals with different levels of CRF.

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO_{2Peak} (p<0.05)

^c Denotes significant difference compared to lean high VO_{2Peak} (p<0.05)

^d Denotes significant difference compared to obese low VO_{2Peak} (p<0.05)

3.5 Impact of CRF on CD4+CD25^{high}CD127^{low} Treg cells and the frequencies of CD39 and CD73 on CD4+CD25⁺ T cells

Figure 3 shows the frequency of CD4+CD25^{high}CD127^{low} Treg cells (Fig.3A) mTreg CD4+CD25+CD39⁺ (Fig.3B) and CD4+CD25+CD73⁺ (Fig.3C) cells. Lean low VO_{2Peak} presented reduced frequencies of Treg cells and CD4+CD25+CD39⁺ mTreg cells than lean high VO_{2Peak} (p<0.001 for both) and obese high VO_{2Peak} (p=0.04 for Treg; p=0.01 for mTreg). Lower frequencies of mTreg cells were also identified in lean low VO_{2Peak} compared to lean and obese groups with moderate VO_{2Peak} (p=0.01; p=0.03, respectively). Moreover, obese low VO_{2Peak} had lower frequencies of Treg than lean low VO_{2Peak} (p=0.02); lower Treg and mTreg proportions than lean moderate (p<0.001; p=0.02, respectively) and high VO_{2Peak} (p<0.001; p<0.001, respectively), and lower frequency of Treg cells than obese high VO_{2Peak} (p<0.001). Obese individuals with moderate VO_{2Peak} presented lower proportions of Treg and mTreg cells than lean high VO_{2Peak} (p<0.001; p=0.03, respectively) and obese high VO_{2Peak} (p=0.03; p=0.04, respectively). Furthermore, lean group with moderate VO_{2Peak} presented higher frequency of Treg cells than obese moderate VO_{2Peak} (p=0.04), but lower proportions of Treg and mTreg cells than lean High VO_{2Peak} (p=0.04; p=0.01, respectively). Finally, obese with high VO_{2Peak} presented higher frequency of CD4+CD25+CD73⁺ T cells (p=0.04 for all) than lean low VO_{2Peak} and obese with moderate VO_{2Peak}.

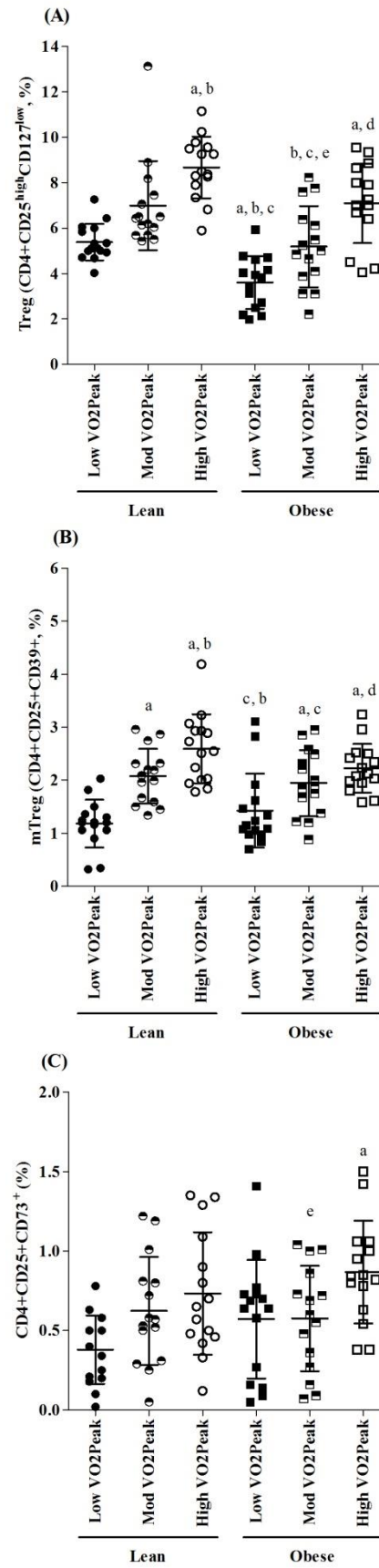


Figure 3. Peripheral frequency of CD4+CD25^{high}CD127^{low} (3A) CD4+CD25+CD39+ (3B) and CD4+CD25+CD73+ (3C) T cells of lean and obese individuals with different levels of CRF.

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation

^a Denotes significant difference compared to lean low VO_{2Peak} (p<0.05)

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO_{2Peak} (p<0.05)

^c Denotes significant difference compared to lean high VO_{2Peak} (p<0.05)

^d Denotes significant difference compared to obese low VO_{2Peak} (p<0.05)

^e Denotes significant difference compared to obese high VO_{2Peak} (p<0.05)

3.6 Effect of CRF on frequency of monocyte subsets

Figure 4 shows the peripheral frequency of classical monocytes (CD14+CD16-; Fig.4A), intermediate monocytes (CD14+CD16+; Fig. 4B), and non-classical monocytes (CD14-CD16+; Fig.4C) in the studied subjects. Obese individuals with low VO_{2Peak} had higher CD14+CD16+ intermediate and CD14-CD16+ monocytes than lean individuals with low, moderate or high VO_{2Peak} and obese individuals with moderate or high VO_{2Peak} (p<0.001 for all). Moreover, obese individuals with moderate VO_{2Peak} had higher CD14+CD16+ and CD14-CD16+ monocytes than lean with moderate and high VO_{2Peak}, and increased proportions of CD14+CD16+ than obese with high VO_{2Peak} (p<0.01 for all) (Fig 4B). In obese individuals who presented high VO_{2Peak}, the peripheral frequency of CD14+CD16+ monocytes was higher than those found in lean individuals with moderate and high VO_{2Peak} (p=0.02 for both). Finally, lean individuals with low VO_{2Peak} presented higher non-classical CD14-CD16+ monocytes than lean individuals with moderate and high VO_{2Peak} (p<0.035), and CD14+CD16+ monocytes than lean high VO_{2Peak} (p<0.034).

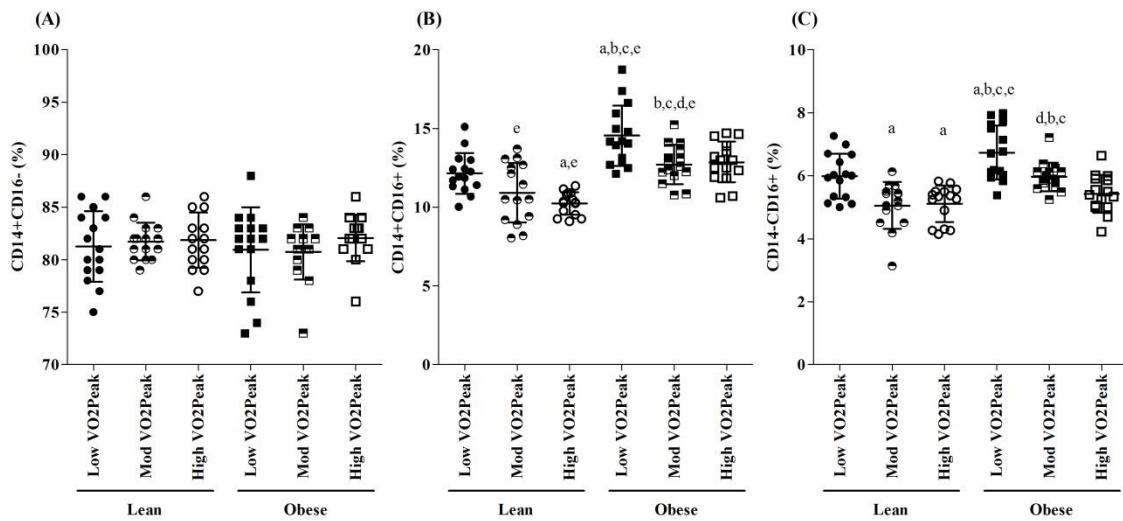


Figure 4. Peripheral frequency of CD14+CD16- (4A), CD14+CD16+ (4B) and CD14-CD16+ (4C) monocytes of lean and obese individuals with different levels of CRF.

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation

^a Denotes significant difference compared to lean low VO₂Peak ($p < 0.05$)

^b Denotes significant difference compared to lean mod VO₂Peak ($p < 0.05$)

^c Denotes significant difference compared to lean high VO₂Peak ($p < 0.05$)

^d Denotes significant difference compared to obese low VO₂Peak ($p < 0.05$)

^e Denotes significant difference compared to obese high VO₂Peak ($p < 0.05$)

3.7 Impact of HIIT on frequency of CD4 subsets and Treg cell

We attempt to test whether one week of HIIT could impact on peripheral frequency of Treg cells (CD4+CD25^{high}CD127^{low}), mTreg (CD4+CD25+CD39+) and CD4+CD25+CD73+ T cells in a group of obese sedentary individuals. After one week of HIIT, an increase in VO₂Peak was found (34.54 ± 3.27 to 35.89 ± 2.71 mL.kg.min, $p = 0.038$). Short-term HIIT increased mTreg (CD4+CD25+CD39+) ($p = 0.038$) (Fig 5A) and Treg cells (CD4+CD25^{high}CD127^{low}) ($p = 0.04$) (Fig. 5C) (Fig 5B).

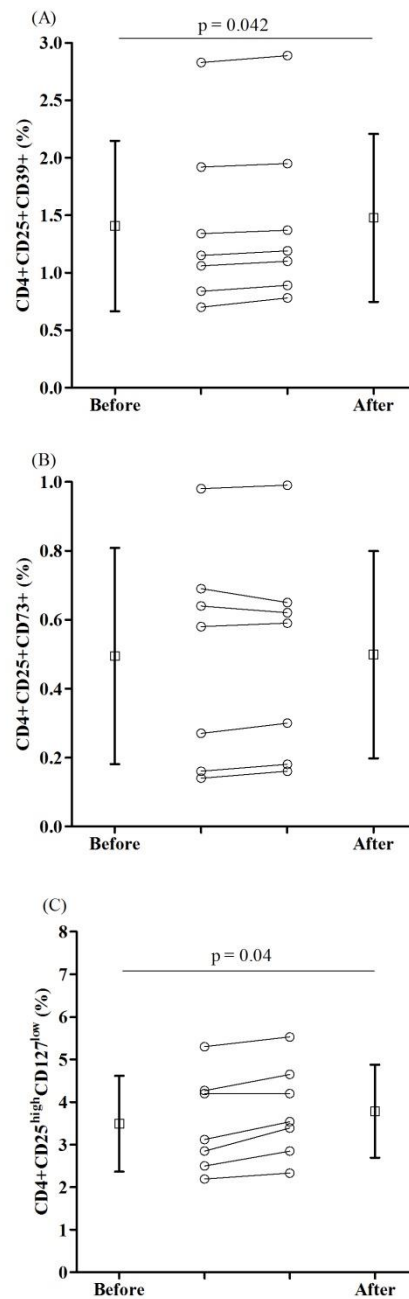


Figure 5. Peripheral frequency of CD4+CD25+CD39+ (5A), CD4+CD25+CD73+ (5B) and CD4+CD25^{high}CD127^{low} (5C) T cells of sedentary obese individuals (n=7) in response to one week of High Intensity Interval Training.

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Before-after comparison through Paired Student t-test ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

Here, we showed for the first time that CRF status modulates the peripheral frequency of Treg cells, mTreg cells and mTeff cells, and the percentage of intermediate and non-classical monocytes in lean and obese individuals with moderate and high VO_{2Peak} . The CRF also affected the systemic levels of IL-6, TNF- α , IL-10 and IL-33 in lean and obese individuals. On the other hand, our data showed that obese individuals with low VO_{2Peak} had higher frequencies of intermediate and non-classical monocytes as well as higher levels of IL-6 and TNF- α than lean individuals. Moreover, we showed that those obese subjects with low CRF displayed higher frequencies of CD3+HLA-DR+ and mTeff cells, and lower percentages of CD8+ T cells, Treg cells and mTreg cells compared to lean individuals. Furthermore, the systemic levels of IL-10 and IL-33 were reduced in obese individuals. Reinforcing the influence of CRF in the immunoregulatory activity of physical exercise, we showed for the first time that one week of HIIT was able to increase the peripheral number of mTreg and Treg cells in obese sedentary individuals.

We focused on CD4+ T cell subpopulations due to their role in coordinating the adaptive immune response, analyzing the expression of ectonucleotidases CD39 and CD73, which plays a pivotal role in the inflammatory and immune response (81). Here, we showed higher frequencies of mTeff CD4+CD25-CD39+ in sedentary obese individuals (low VO_{2Peak}) compared to lean individuals independently of the degree of CRF. On the other hand, a progressive decrease in mTeff cells was observed in both obese with moderate and high VO_{2Peak} groups. In addition, we observed that low CRF increases CD3+HLA-DR+ T cell frequency in lean and obese subjects. The higher activation markers and mTeff cells in obese individuals may be linked with the higher leptin concentrations, an adipokine with strong effects on T cell activation to a proinflammatory response (222). Using different T cell markers, a cohort of obese sedentary children presented higher mTeff cells and lower T naive

cells than lean and overweight individuals (223). However, CRF was associated with lower proportions of senescent T cells and higher frequencies of naïve T cells independently of BMI and percentage body fat (15).

High expression of CD39 in T lymphocytes was previously identified in type 2 diabetes and correlated with fasting glucose (99). The CD39 is recognized as a marker of cell activation, and its expression in CD4⁺CD25⁻ T cells is linked to higher production of pro-inflammatory IL-17a and interferon-gamma by lymphocytes (84,224). Moreover, Guzman-Flores et al (101) identified higher expression of CD39 and lower expression of CD73 on CD4⁺ and CD4⁺CD25⁺ T cells. However, in this study both diabetic and non-diabetic obese patients were older than lean controls, and age may be a potential confounder of T cell phenotype. Thus, while an excess of fat mass and low physical fitness was able to increase the frequency of mTeff cells (CD4⁺CD25⁻CD39⁺) and markers of activation, the increment in CRF could attenuate the impact of obesity on inflammation.

Obese individuals with high VO_{2Peak} had higher frequencies of CD4⁺CD25⁺CD73⁺ T cells than individuals with low VO_{2Peak}. The surface expression of CD73 on CD4⁺CD25^{high} is negligible, but abundant in the cytoplasm of these cells and may translocate to the cell surface in response to specific stimuli, converting AMP to adenosine which contribute to immunosuppressive action of Tregs (81). Thus, the increase of CD73 expression on CD4⁺CD25⁺ T cells from obese with higher VO_{2Peak} may be related to increasing Treg cells frequency.

In fact, we identified higher frequencies of Treg cells and mTreg CD4⁺CD25⁺CD39⁺ in lean and obese individuals with moderate and higher VO_{2Peak}. Weinhold and co-workers (200) showed that Olympic elite athletes with high CRF had higher Treg cells compared to athletes with low CRF. Moreover, healthy individuals with higher levels of weekly physical

activity presented higher frequencies of Treg cells and IL-10 production than sedentary subjects (16).

Immunoregulatory IL-10 and IL-33 plasma levels were elevated in moderate and high CRF individuals. IL-33 is a member of IL-1 family that induces the Th2 and anti-inflammatory cytokines production. In healthy lean adipose tissue, IL-33 orchestrate the development and maintenance of Tregs through ST2 axis (74,75). In obese mice treated with high fat diet, the decreased frequency of Treg cells and CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺ cells was abolished by the treatment with IL-33, reverting visceral adipose tissue inflammation and insulin resistance (77). In this way, exercise emerges as a low-cost alternative to improve obesity-related inflammatory disorders through increases in IL-10 and IL-33 concentrations.

Furthermore, it was demonstrated that regular exercise increases Foxp3 expression on CD4⁺CD25⁺ T cells (225,226). Here, a one week HIIT was able to increase the peripheral frequency of Treg and mTreg cells in obese individuals. Moreover, we previously showed that interval exercise was more effective to enhance the systemic levels of IL-10, an immunoregulatory cytokine secreted mainly by Treg cells, than the moderate exercise in obese individuals (181). Mechanistically, a recent study demonstrated that the adrenergic stimulation induced by exercise enhances the immunosuppressive function of Treg cells in mice (163). In this way, the catecholamine discharge during repeated bouts of HIIT may contribute to the increase of Treg cells and their immunosuppressive actions.

Higher frequencies of mTreg were identified in both lean and obese individuals with moderate and high CRF. The CD39 expression on CD4⁺Foxp3⁺ cells was inversely correlated with BMI and waist: hip ratio in both non-diabetic and type 2 diabetes patients (100). The increase in mTreg frequency was related to abrogation of proinflammatory ATP-dependent effects such as cellular toxicity (96,180). In patients following kidney transplantation, the stable frequencies of CD4⁺CD25⁺CD39⁺ cells were associated with low

risk of renal allograft rejection, highlighting its immunosuppression action (88). In this way, some of the immunoregulatory effects of regular exercise may be attributed to the enhancement in the proportions of mTreg CD4⁺CD25⁺CD39⁺ cells.

Interestingly, obese individuals with low CRF had lower frequency of CD8⁺ T cells than lean with low, moderate or high VO_{2Peak}. In addition, obese individuals with low VO_{2Peak} had a CD4:CD8 ratio of 2.56 ± 1.17 . Cytotoxic CD8⁺ T cells infiltrate inflamed adipose tissue to promote recruitment, differentiation and activation of proinflammatory M1 macrophages, reducing the percent of CD8⁺ T cells in the circulation from sedentary obese individuals (30). On the other, Kawanishi et al. (227) demonstrated that in obese mice the exercise training reduces the frequencies of CD8⁺ T cells and macrophages in adipose tissue. Increases in CRF reduce the CD8⁺ T cell migration to adipose tissue, and maintaining the frequency of circulating CD8⁺ T cell at stable values.

Both physical inactivity and visceral fat accumulation lead to a chronic low grade inflammation state (14). Conversely, we showed that the combination of low CRF and obesity amplifies the inflammatory state as visualized by the higher TNF- α concentrations and lower levels of IL-10 and IL-33 in obese and lean individuals with low VO_{2Peak}. On the other hand, obese individuals with moderate and high VO_{2Peak} presented lower levels of proinflammatory mediators (TNF- α and IL-6) and increased IL-10 and IL-33 levels than low fit individuals. In overweight-obese subjects, Hong et al. (203) demonstrated that a better CRF predicted lower TNF- α and IL-1 β plasma levels by a mechanism dependent of β -adrenergic receptor sensitivity in monocytes from obese individuals. In fact, exercise-induced adrenergic stimulation reduces the monocyte intracellular TNF- α production during acute bouts (203). Moreover, obese mice who trained aerobically improved the lymphatic dysfunction and attenuated the TNF- α levels without changes in adipose mass (228).

In this way, lean and obese individuals with higher cardiorespiratory fitness presented lower frequency of intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14⁻CD16⁺) monocytes. Intermediate and non-classical monocytes have phenotypic alterations such as the higher proinflammatory cytokine production, less antimicrobial activity, and higher antigen processing and presentation (229). It was demonstrated that elderly individuals submitted to 12 week resistance training had lower proportions of intermediate monocytes and diminished lipopolysaccharide-stimulated TNF- α production without changes in fat mass (205). Exercise training reduced the number of haematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) expressing the chemokine receptor CCR2 and the Toll-Like Receptor-4 (TLR-4) in previous sedentary lean and obese individuals (211). Both CCR2 and TLR-4 are elevated in intermediate and non-classical monocyte subsets, and the reduction of these markers in HSPCs through exercise may indicate attenuation in the inflammatory monocytes profile.

5. CONCLUSION

In conclusion, obesity and low CRF exerts a negative impact on several markers of immune response. Our data provide novel insights about CRF status on the immune system, highlighting that physical exercise modulate several aspects of chronic inflammation, most notably monocyte subsets, regulatory cells, expression of CD39 and CD73 and systemic cytokine levels.

Competing of interests

The authors state no conflict of interest.

Fundings

We are grateful to the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) –Finance Code 001, CAPES (CAPES-PNPD - 23038007200/11-08) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support. PDL, AP and PRTR also thank CNPq for fellowships.

REFERENCES

- [1] Heymsfield SB, Wadden TA. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *N Engl J Med* 2017;376:254–66. doi:10.1056/NEJMra1514009.
- [2] Tchernof A, Despres J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev* 2013;93:359–404. doi:10.1152/physrev.00033.2011.
- [3] Devêvre EF, Renovato-Martins M, Clément K, Sautès-Fridman C, Cremer I, Poitou C. Profiling of the Three Circulating Monocyte Subpopulations in Human Obesity. *J Immunol* 2015. doi:10.4049/jimmunol.1402655.
- [4] Dorneles GP, Boeira MCR, Schipper LL, Silva IRV, Elsner VR, Dal Lago P, et al. Acute Strenuous Exercise Induces an Imbalance on Histone H4 Acetylation/Histone Deacetylase 2 and Increases the Proinflammatory Profile of PBMC of Obese Individuals. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017. doi:10.1155/2017/1530230.
- [5] Bharath LP, Ip BC, Nikolajczyk BS. Adaptive immunity and metabolic health: Harmony becomes dissonant in obesity and aging. *Compr Physiol* 2017. doi:10.1002/cphy.c160042.
- [6] Yang H, Youm Y-H, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 2010. doi:10.4049/jimmunol.1000021.
- [7] Han JM, Wu D, Denroche HC, Yao Y, Verchere CB, Levings MK. IL-33 Reverses an Obesity-Induced Deficit in Visceral Adipose Tissue ST2⁺ T Regulatory Cells and Ameliorates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *J Immunol* 2015. doi:10.4049/jimmunol.1500020.
- [8] Wagner NM, Brandhorst G, Czepluch F, Lankeit M, Eberle C, Herzberg S, et al. Circulating regulatory T cells are reduced in obesity and may identify subjects at increased metabolic and cardiovascular risk. *Obesity* 2013. doi:10.1002/oby.20087.
- [9] Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008. doi:10.1038/nri2343.
- [10] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 2008. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.
- [11] Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity* 2013. doi:10.1016/j.immuni.2013.03.002.
- [12] Liu W, Putnam AL, Xu-yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 2006. doi:10.1084/jem.20060772.
- [13] Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005.
- [14] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 2007. doi:10.1084/jem.20062512.
- [15] Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4⁺CD25⁺T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant* 2010. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03291.x.
- [16] Guzman-Flores JM, Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, Vargas-Morales JM, Cataño-Cañizalez YG, Rodríguez-Rivera JG, et al. Expression of CD73 and A2A receptors in cells from subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Immunobiology* 2015. doi:10.1016/j.imbio.2015.02.007.
- [17] Cortez-Espinosa N, Cortés-García JD, Martínez-Leija E, Rodríguez-Rivera JG, Barajas-López C, González-Amaro R, et al. CD39 expression on Treg and Th17 cells is

- associated with metabolic factors in patients with type 2 diabetes. *Hum Immunol* 2015. doi:10.1016/j.humimm.2015.09.007.
- [18] Hong S, Dimitrov S, Pruitt C, Shaikh F, Beg N. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: Role of beta adrenergic receptors. *Brain Behav Immun* 2014. doi:10.1016/j.bbi.2013.12.009.
 - [19] Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun* 2011. doi:10.1016/j.bbi.2011.07.226.
 - [20] Balady GJ, Arena R, Sietsema K, Myers J, Coke L, Fletcher GF, et al. Clinician 's Guide to Cardiopulmonary Exercise Testing in Adults A Scientific Statement From the American Heart Association 2010:191–225. doi:10.1161/CIR.0b013e3181e52e69.
 - [21] Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol* 2013;113:1839–48. doi:10.1007/s00421-013-2614-y.
 - [22] Weinhold M, Shimabukuro-Vornhagen A, Franke A, Theurich S, Wahl P, Hallek M, et al. Physical exercise modulates the homeostasis of human regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1607–1610.e3. doi:10.1016/j.jaci.2015.10.035.
 - [23] Herdy AH, Caixeta A. Brazilian Cardiorespiratory Fitness Classification Based on Maximum Oxygen Consumption. *Arq Bras Cardiol* 2016;389–95. doi:10.5935/abc.20160070.
 - [24] Jackson AS, Pollock ML. Generalized equations for predicting body density of men. *Br J Nutr* 1978. doi:10.1079/BJN19780152.
 - [25] Dorneles GP, Haddad DO, Fagundes VO, Vargas BK, Kloecker A, Romão PRT, et al. High intensity interval exercise decreases IL-8 and enhances the immunomodulatory cytokine interleukin-10 in lean and overweight-obese individuals. *Cytokine* 2016. doi:10.1016/j.cyto.2015.10.003.
 - [26] Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, MacIver NJ. Leptin Metabolically Licenses T Cells for Activation To Link Nutrition and Immunity. *J Immunol* 2014. doi:10.4049/jimmunol.1301158.
 - [27] Spielmann G, Johnston CA, O'Connor DP, Foreyt JP, Simpson RJ. Excess body mass is associated with T cell differentiation indicative of immune ageing in children. *Clin Exp Immunol* 2014;176:246–54. doi:10.1111/cei.12267.
 - [28] García-Hernández MH, Portales-Cervantes L, Cortez-Espinosa N, Vargas-Morales JM, Fritche Salazar JF, Rivera-López E, et al. Expression and function of P2X7 receptor and CD39/Entpd1 in patients with type 2 diabetes and their association with biochemical parameters. *Cell Immunol* 2011;269:135–43. doi:10.1016/j.cellimm.2011.03.022.
 - [29] Pulte ED, Broekman MJ, Olson KE, Drosopoulos JHF, Kizer JR, Islam N, et al. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb Res* 2007;121:309–17. doi:10.1016/j.thromres.2007.04.008.
 - [30] Kolodin D, Van Panhuys N, Li C, Magnuson AM, Cipolletta D, Miller CM, et al. Antigen- and cytokine-driven accumulation of regulatory t cells in visceral adipose tissue of lean mice. *Cell Metab* 2015. doi:10.1016/j.cmet.2015.03.005.
 - [31] Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, et al. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* 2015. doi:10.1038/ni.3085.
 - [32] Yeh S-H, Lai H-L, Hsiao C-Y, Lin L-W, Chuang Y-K, Yang Y-Y, et al. Moderate Physical Activity of Music Aerobic Exercise Increases Lymphocyte Counts, Specific

- Subsets, and Differentiation. *J Phys Act Heal* 2014. doi:10.1123/jpah.2012-0508.
- [33] Yeh SH, Chuang H, Lin LW, Hsiao CY, Wang PW, Yang KD. Tai Chi Chuan exercise decreases A1C levels along with increase of regulatory T-cells and decrease of cytotoxic T-cell population in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2007;30:716–8. doi:10.2337/dc06-1507.
 - [34] Dugger KJ, Chrisman T, Sayner SL, Chastain P, Watson K, Estes R. Beta-2 adrenergic receptors increase TREG cell suppression in an OVA-induced allergic asthma mouse model when mice are moderate aerobically exercised. *BMC Immunol* 2018;19:1–13. doi:10.1186/s12865-018-0244-1.
 - [35] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007. doi:10.1182/blood-2006-12-064527.
 - [36] Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O’Farrelly C, et al. CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 2009. doi:10.4049/jimmunol.0901881.
 - [37] McRae JL, Chia JS, Pommey SA, Dwyer KM. Evaluation of CD4⁺ CD25^{+/-} CD39⁺ T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection. *Nephrology* 2017;22:505–12. doi:10.1111/nep.12894.
 - [38] Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009. doi:10.1038/nm.1964.
 - [39] Kawanishi N, Mizokami T, Yano H, Suzuki K. Exercise attenuates M1 macrophages and CD8⁺ T cells in the adipose tissue of obese mice. *Med Sci Sports Exerc* 2013. doi:10.1249/MSS.0b013e31828ff9c6.
 - [40] Pedersen BK. The Physiology of Optimizing Health with a Focus on Exercise as Medicine 2019;1–21. doi:10.1146/annurev-physiol-020518.
 - [41] Hespe GE, Kataru RP, Savetsky IL, García Norez GD, Torrisi JS, Nitti MD, et al. Exercise training improves obesity-related lymphatic dysfunction. *J Physiol* 2016. doi:10.1113/JP271757.
 - [42] Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol* 2006. doi:10.1189/jlb.0806510.
 - [43] Markofski MM, Flynn MG, Carrillo AE, Armstrong CLH, Campbell WW, Sedlock DA. Resistance exercise training-induced decrease in circulating inflammatory CD14⁺CD16⁺ monocyte percentage without weight loss in older adults. *Eur J Appl Physiol* 2014. doi:10.1007/s00421-014-2902-1.
 - [44] Niemi GM, Allen JM, Mailing LJ, Khan NA, Holscher HD, Woods JA, et al. Effects of endurance exercise training on inflammatory circulating progenitor cell content in lean and obese adults. *J Physiol* 2018;0:1–12. doi:10.1113/JP276023.

7. CAPÍTULO V

7.1 Visão geral

O impacto da obesidade sobre o sistema imune possui grande interesse clínico, uma vez que a inflamação crônica é um elo fundamental entre a obesidade e o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas e certos tipos de câncer (1). Por outro lado, dados emergentes demonstram o benefício do exercício físico e do condicionamento cardiorrespiratório sobre a imunidade celular e no tratamento da inflamação crônica (2–4). De fato, efeitos antagônicos da obesidade e do condicionamento cardiorrespiratória são identificados em aspectos moleculares e celulares do sistema imune (5–7). Os estudos provenientes desta tese de doutorado foram elaborados com o objetivo de avaliar o impacto agudo de diferentes tipos de exercício físico bem como o do exercício físico crônico em mecanismos da resposta inflamatória e imunidade celular de indivíduos eutróficos e obesos.

7.2 Estudo I

O estudo I nesta tese, inserido no capítulo II, teve como objetivo principal avaliar o efeito agudo de um exercício exaustivo sobre marcadores epigenéticos em células mononucleares periféricas humanas estimuladas com LPS, a produção de citocinas pró-inflamatórias e a frequência periférica de subtipos de monócitos em homens eutróficos e obesos. Os achados do estudo indicaram que a estimulação com LPS sobre células mononucleares de indivíduos obesos induziu um estado de hiperacetilação da histona H4 e uma baixa atividade da enzima HDAC2 em comparação à células mononucleares de indivíduos eutróficos. De modo interessante, este estado hiperacetilado de histona H4 da célula mononuclear foi acompanhado por uma maior frequência periférica de monócitos pró-inflamatórios e maior produção de IL-6, IL-8 e TNF- α , confirmando as relações entre eventos epigenéticos e o estado inflamatório crônico de indivíduos obesos. O exercício exaustivo aumentou o estado hiperacetilado de PBMCs e reduziu a atividade da HDAC2 tanto em condições de não estimulação quanto de estimulação com LPS em indivíduos obesos. Estas modificações epigenéticas observadas após o exercício foram acompanhadas por um aumento nas concentrações de IL-8 e TNF- α e na frequência de monócitos CD14+CD16+.

O sistema imunológico apresenta grande plasticidade e as células imunes são altamente moduladas de acordo com os sinais e mediadores recebidos do meio em que se encontram. Um sistema fisiológico não saudável, como identificado na obesidade e na inatividade física, induzem modificações epigenéticas que possibilitam o aumento da

transcrição de genes pró-inflamatórios (8,9). Fatores sistêmicos liberados pelo tecido adiposo, como a leptina, aumentam a ativação de vias de sinalização inflamatórias MAPKs/NF- κ B através da acetilação de histona H4 (10). Por outro lado, a ação imunossupressora de glicocorticoides está relacionada a uma maior atividade da enzima HDAC2 (11), confirmando que mediadores do meio extracelular influenciam modificações epigenéticas em células imunes.

O exercício físico é considerado um subtipo de estresse físico, como estresse térmico e traumático, que modula induz diversas alterações nos sistemas cardiovascular, neuromuscular, endócrino e imunológico (12). Exercícios extremos e com grande dano tecidual estão relacionados a uma resposta inflamatória exacerbada (13). Assim, uma sessão de exercício exaustivo, realizado através de um protocolo de exercício em degrau até a fadiga, amplificou a resposta inflamatória de indivíduos obesos através de um estado de hiperacetilação da histona H4 e redução da atividade da enzima HDAC2 em células mononucleares de indivíduos obesos. De modo interessante, esta modulação epigenética não foi identificada em indivíduos eutróficos.

Uma sessão de exercício vigoroso aumentou a forforilação do NF- κ B em PBMCs de indivíduos saudáveis (14). Assim, o aumento da resposta inflamatória, identificado pelo aumento na produção de TNF- α e IL-8 e no aumento da frequência de monócitos CD14+CD16+, após uma sessão de exercício exaustivo está relacionado a um estado de menor repressão na transcrição gênica induzido por eventos de acetilação de histonas. Por outro lado, um estudo conduzido por Lavratti e colaboradores (15) identificou uma redução no estado global de acetilação na histona H4 em conjunto a uma redução na produção de IL-6 e INF- γ por células mononucleares estimuladas com fitohemaglutinina. Assim, o estado da cromatina parece influenciar a resposta inflamatória durante o exercício. Nosso grupo identificou que uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade aumentou a atividade da HDAC global em células mononucleares de indivíduos obesos em conjunto a elevações nas concentrações sistêmicas de IL-10 e TGF- β (16).

7.3 Estudo II

O estudo II nesta tese, inserido no capítulo III, teve como objetivo investigar o impacto da capacidade cardiorrespiratória sobre a mobilização de células T CD4+CD25-CD39+ mTeff e CD4+CD25+CD39+ mTreg em resposta a uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade. Neste capítulo, nossos resultados principais indicaram que a

capacidade cardiorrespiratória apresentava correlação positiva com a frequência periférica de mTreg e uma correlação negativa com a frequência periférica de mTeff. O exercício intervalado de alta intensidade induziu uma grande mobilização de células mTeff e mTreg imediatamente após a sessão em ambos os grupos. Enquanto a frequência periférica de mTreg permaneceu elevada 1 h após a sessão em ambos os grupos; uma redução na frequência de mTeff foi observada no grupo com alta capacidade cardiorrespiratória 1 h após a sessão, permanecendo alta no grupo de baixa capacidade cardiorrespiratória. Estes dados indicam a redistribuição de subtipos de células T CD4⁺ após o exercício dependente, ao menos em parte, da capacidade cardiorrespiratória.

A linfocitose e linfopenia são resposta imunes no padrão de distribuição celular bem estabelecidos no exercício agudo (17). Teorias recentes indicam que estes processos possuem finalidade de redistribuir células T para sítios inflamados ou que possuem maior potencial de infecção (5). Enquanto dados prévios confirmavam a redistribuição de linfócitos T com fenótipo efetor, e uma elevação na frequência periférica de linfócitos Tregs em resposta ao exercício intervalado (18), a expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 em células T CD4⁺ durante sessões de exercício agudo ainda era pouco estudado. A mobilização de células T CD4⁺CD25⁺CD39⁺ mTreg em conjunto a maior expressão de CD73 em células T CD4⁺CD25⁺ em resposta ao exercício intervalado confirma o potencial anti-inflamatório desta modalidade de exercício. De fato, uma maior frequência de célula mTreg na circulação no período de até 1-h após a sessão está relacionado a maior atividade imunossupressora e menor secreção de citocinas pró-inflamatórias (19,20). De fato, Gleeson e colaboradores (4) acreditavam que o aumento de células Tregs induzida pelo exercício seria um dos mecanismos pelos quais a inflamação crônica seria controlada; nossos dados confirmam a hipótese dos autores sobre o impacto do exercício na imunoregulação. Além disso, tanto indivíduos sedentários quanto indivíduos fisicamente ativos apresentam o mesmo padrão de mobilização de células mTregs.

Por outro lado, nossos dados indicam que a redistribuição de células mTeff após o exercício é dependente do condicionamento cardiorrespiratório. As células T CD4⁺CD25⁺CD39⁺ apresentam um perfil pró-inflamatório, de secreção de citocinas Th1/Th17, e que migram para tecidos inflamados em resposta ao aumento nos níveis de ATP e outros nucleotídeos (21,22). Assim, a manutenção de células mTeff na circulação de indivíduos sedentários após uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade, pode indicar que estes sujeitos apresentam algum nível de inflamação sistêmica apesar o aumento concomitante de células mTreg.

7.4 Estudo III

O estudo final desta tese (estudo III), inserido no capítulo IV, avaliou a frequência periférica de células Tregs CD4+CD25^{high}CD127^{low}, a expressão de CD39 e CD73 em células T CD4+, subtipos de monócitos e os níveis sistêmicos de citocinas em homens eutróficos e obesos com diferentes níveis de capacidade cardiorrespiratória. Os principais achados deste estudo indicaram que uma maior capacidade cardiorrespiratória em indivíduos obesos modulou as alterações na frequência de células Tregs, mTeff CD4+CD25-CD39+ e mTreg CD4+CD25+CD39+ e o percentual de monócitos intermediários e não-clássicos induzidas pelo excesso de tecido adiposo na obesidade. Além disso, um desequilíbrio nas concentrações de citocinas pró- e anti-inflamatórias foi identificada em relação a capacidade cardiorrespiratória, sobretudo por um aumento nos níveis de IL-6 e TNF- α e níveis reduzidos de IL-10 e IL-33, em indivíduos obesos e eutróficos com baixo VO_{2Pico}.

De fato, a capacidade cardiorrespiratória apresenta importante impacto em aspectos metabólicas e também nos níveis sistêmicos de citocinas tanto em indivíduos eutróficos quanto em obesos (23,24). Nosso estudo adicionou novos achados sobre o impacto da baixa capacidade cardiorrespiratória na imunidade celular. Os exatos mecanismos pelos quais a baixa capacidade cardiorrespiratória induzem um estado inflamatório crônico permanecem a ser elucidados, no entanto algumas hipóteses podem ser levantadas: a) aspectos metabólicos, como elevações em ácidos graxos livres, glicose e mediadores lipídicos, servem de substratos energéticos para a modulação da resposta inflamatória. O estado dislipidêmico e hiperglicêmico em indivíduos com baixa capacidade cardiorrespiratória ativa células imunes, como monócitos, estando relacionado a maior produção de TNF- α (25,26); b) alterações hormonais como o estado hiperinsulinêmico e modificações nas concentrações de catecolaminas podem modificar o estado de ativação imune, como dessensibilização de receptores β -adrenérgicos em células imunes, em indivíduos sedentários está associado a uma maior ativação de monócitos pró-inflamatórios e um padrão Th1 de resposta imune (27,28); c) indivíduos sedentários apresentam maiores níveis de endotoxemia sistêmica, que podem ativar de modo crônico receptores TLR e a cascata inflamatória em monócitos de modo a aumentar as citocinas pró-inflamatórias (29); d) indivíduos sedentários possuem menores níveis sistêmicos de HSP-72 kda em conjunto a um desequilíbrio no estado redox, o que pode contribuir para a inflamação subclínica (30,31).

Além destes fatores acima mencionados, a inatividade física, e baixos níveis de condicionamento cardiorrespiratório, induz um acúmulo ectópico de adiposidade visceral, ao qual é responsável por maior acúmulo de macrófagos M1 e secreção de citocinas pró-inflamatórias (7,32). Nossos dados indicam que uma maior capacidade cardiorrespiratória reduz esta associação entre adiposidade central-inflamação. No entanto, nós reconhecemos que a falta de avaliação de medidas diretas de adiposidade visceral, não apenas medidas de perímetria, em nosso estudo representa uma limitação metodológica. Por outro lado, a capacidade de secreção de miocinas pelo músculo também parece exercer importante influência sobre o sistema imunológico. Neste sentido, Duggal e colaboradores (33) identificaram que idosos atletas apresentavam menor frequência periférica de células T de memória efetora e maior capacidade tímica em conjunto a níveis elevados de IL-7 e IL-15, duas citocinas/miocinas com importantes funções na regulação da geração e maturação de células T.

Por fim, desequilíbrios no sistema purinérgico podem representar um importante aspecto na ativação crônica do sistema imune na obesidade e na inatividade física. Estudos anteriores destacaram que leucócitos residentes no tecido adiposo de indivíduos obesos apresentam uma baixa eficiência na hidrólise de nucleotídeos em conjunto a um acúmulo exagerado de ATP extracelular (34). Estas alterações foram correlacionadas a uma maior frequência de células T CD4+CD39+, CD3+FoxP3-CD39+ e um padrão Th17 no tecido adiposo inflamado (35). Nossos dados obtidos no estudo III foram os primeiros a enfatizarem que uma maior capacidade cardiorrespiratória reduz a frequência de células T CD4+CD25-CD39+, relacionadas ao padrão Th1/Th17, em conjunto a uma maior frequência de células T CD4+CD25+CD39+, de maior atividade imunoreguladora. Deste modo, a modulação do sistema purinérgico pode sofrer grande influência tanto do nível de condicionamento físico quanto da inatividade física, reduzindo o impacto da obesidade.

Por fim, nossos dados do estudo III indicaram que o condicionamento cardiorrespiratório exerce papel importante na geração de uma resposta imunoreguladora. Tanto em indivíduos obesos quanto eutróficos, uma frequência elevada de células Tregs e CD4+CD25+CD39+ mTregs e baixa frequência de células CD4+CD25-CD39+ mTeff, além de aumento nos níveis sistêmicos de IL-10 e IL-33 em conjunto a concentrações reduzidas de TNF- α foram identificadas em uma relação dependente do grau de classificação do VO2Max,

ou seja, quanto maior a capacidade cardiorrespiratória maior a frequência das células Treg e mTregs.

Indivíduos com alta capacidade aeróbia possuem maior frequência periférica de células Tregs e maior produção de IL-10 do que indivíduos sedentários (36). Além disso, uma maior frequência e atividade imunossupressora de células Tregs foi identificada em atletas olímpicos com alto VO_{2Max} em comparação a atletas olímpicos com menor capacidade cardiorrespiratória (3). No entanto, estes estudos não avaliaram o impacto antagônico da obesidade e do nível de condicionamento cardiorrespiratório na imunoregulação de células Tregs. Assim, nosso estudo foi o primeiro a identificar o papel protetivo do exercício físico sobre células imunoreguladoras em indivíduos obesos. Do mesmo modo, uma relação entre a capacidade cardiorrespiratória e a frequência de células mTeff em indivíduos eutróficos e obesos foi identificada, confirmando os achados prévios de Spielmann e colaboradores (2) que avaliaram diferentes fenótipos de células T, através da expressão de CD28 e outros marcadores de senescência celular, em indivíduos eutróficos saudáveis. Dados prévios demonstraram que uma maior frequência de células mTreg e baixa frequência de células mTeff em pacientes com doença renal crônica se relacionavam a menor taxa de rejeição ao transplante renal, enfatizando a importância da imunoregulação mediada por estas células (19).

7.5 Perspectivas Futuras

Como perspectivas futuras, estudos longitudinais são necessários para identificar o impacto de diferentes modelos de treinamento físico sobre o fenótipo de monócitos e células T, bem como sobre as atividades funcionais como reconhecimento e apresentação de antígeno, produção de citocinas, fagocitose, citotoxicidade e proliferação celular. Uma vez que a inflamação crônica na obesidade exerce um papel fundamental no desenvolvimento de certos tipos de câncer e respostas diminuídas contra patógenos, a investigação do efeito do exercício físico sobre marcadores de ativação celular (ex., CD28) e de inibição celular (ex., PD-1 e CTLA-4) torna-se necessário.

Apesar de os artigos I e II apresentarem aspectos celulares e moleculares da resposta imune ao exercício, eventos epigenéticos e expressão de ectonucleotidases em células T, respectivamente, não foi possível nesta tese avaliar os dois eventos de modo simultâneo ou no mesmo protocolo de exercício. No entanto, os resultados obtidos possibilitam a geração de uma hipótese sobre o envolvimento epigenéticos na modulação da resposta inflamatória

através da modificação do fenótipo de células e da expressão de ectonucleotidases. Assim, futuros estudos devem ser realizados para avaliar a expressão de ectonucleotidases e mecanismos epigenéticos na resposta imune a diferentes modelos de exercício físico.

Dados prévios do nosso laboratório, não inclusos nesta tese, demonstram que a incubação de células mononucleares com o plasma obtido após o exercício intervalado reduz a produção de TNF- α . Por outro lado, a incubação do soro obtido após uma sessão de exercício exaustivo com células mononucleares estimula uma maior resposta inflamatória. Estes dados podem indicar que solutos liberados durante o exercício modulam o estado inflamatório de células imunes.

8. CONCLUSÕES

Considerando as complexas relações entre a obesidade e o sistema imune, e o potencial impacto do exercício físico no controle da resposta inflamatória, as principais conclusões desta tese de doutorado são:

Em indivíduos obesos, um aumento na acetilação da histona H4 e redução na atividade da enzima HDAC2 em células mononucleares estimuladas com LPS é identificada em conjunto a uma maior produção de citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α e a um perfil de monócitos pró inflamatórios CD14+CD16+;

Uma sessão de exercício exaustivo aumentou o estado inflamatório de células mononucleares através de um estado de hiperacetilação da histona H4 em condições de não estimulação e estimulação com LPS;

A capacidade cardiorrespiratória apresenta correlação positiva com a frequência periférica de células mTreg CD4+CD25+CD39+ e negativa com células mTeff CD4+CD25-CD39+;

Uma sessão de exercício intervalado aumenta a frequência periférica de células mTreg de modo independente ao nível de condicionamento físico;

O padrão de redistribuição de células mTeff após o exercício é dependente ao nível de condicionamento físico;

Um maior nível de VO2Pico está associado ao aumento da frequência periférica de células Tregs, células mTreg e a uma menor frequência de células mTeff e de monócitos intermediários e não clássicos em indivíduos eutróficos e obesos;

Um maior nível de VO2Pico está associado a redução da condição de inflamação crônica de baixo grau, avaliado pelos níveis de IL-6, TNF- α , IL-10 e IL-33, em indivíduos obesos;

Uma semana de exercício intervalado de alta intensidade elevou a frequência periférica de células Treg e mTreg em indivíduos obesos sedentários.

REFERÊNCIAS

1. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017; 542(7640):177-185.
2. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun*. 2011; 25(8):1521-9.
3. Weinhold M, Shimabukuro-Vornhagen A, Franke A, Theurich S, Wahl P, Hallek M, et al. Physical exercise modulates the homeostasis of human regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;137(5):1607–1610.e3.
4. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11(9):607-15.
5. Campbell JP, Turner JE. Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: Redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Frontiers in Immunology*. 2018 ;9:648.
6. Karsten K, Frank-Christoph M, Christian P. The immunomodulatory effects of physical activity. *Curr Pharm Des*. 2016;3730–48.
7. Pedersen BK. The Physiology of Optimizing Health with a Focus on Exercise as Medicine. 2019;1–21.
8. Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, et al. Proteomics Analysis of Human Obesity Reveals the Epigenetic Factor HDAC4 as a Potential Target for Obesity. *PLoS One*. 2013; 8(9):e75342.
9. Costantino S, Mohammed SA, Ambrosini S, Paneni F. Epigenetic processing in cardiometabolic disease. *Atherosclerosis*. 2018; S0021-9150(18)31402-3.
10. Hsu P-S, Wu C-S, Chang J-F, Lin W-N. Leptin Promotes cPLA2 Gene Expression through Activation of the MAPK/NF- κ B/p300 Cascade. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(11):27640-58.
11. Zhang H, He Y, Zhang G, Li X, Yan S, Hou N, et al. HDAC2 is required by the physiological concentration of glucocorticoid to inhibit inflammation in cardiac fibroblasts. *Can J Physiol Pharmacol*. 2017; 95(9):1030-1038.
12. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol Rev*. 2000;80(3):1055–81.

13. Cooper DM, Radom-Aizik S, Schwindt C, Zaldivar F. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J Appl Physiol.* 2007;103(2):700–9.
14. Kim SY, Jun TW, Lee YS, Na HK, Surh YJ, Song W. Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor- κ B DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2009; 1171:464-71.
15. Lavratti C, Dorneles G, Pochmann D, Peres A, Bard A, de Lima Schipper L, et al. Exercise-induced modulation of histone H4 acetylation status and cytokines levels in patients with schizophrenia. *Physiol Behav.* 2017;168.
16. Dorneles GP, da Silva IRV, Korb A, Bertoldi K, Siqueira IR, Elsner VR, et al. High intensity interval exercise enhances the global HDAC activity in PBMC and anti-inflammatory cytokines of overweight-obese subjects. *Obes Med.* 2016;2.
17. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Jeffrey MG, Woods A, Bishop NC, et al. Part one : Immune function and exercise. *EIR 17 2011 position statement.* 2011;
18. KrÄ¼ger K, Alack K, Ringseis R, Mink L, Pfeifer E, Schinle M, et al. Apoptosis of T-Cell Subsets after Acute High-Intensity Interval Exercise. Vol. 48, *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2016. 2021-2029 p.
19. McRae JL, Chia JS, Pommey SA, Dwyer KM. Evaluation of CD4 + CD25 +/- CD39 + T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection. *Nephrology.* 2017;22(7):505–12
20. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine.* 2013; 19(6):355-67
21. Magid-Bernstein JR, Rohowsky-Kochan CM. Human CD39 + T reg Cells Express Th17-Associated Surface Markers and Suppress IL-17 via a Stat3-Dependent Mechanism. *J Interf Cytokine Res.* 2017;37(4):153–64.
22. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, Evans J, Eddaoudi A, Eaton S, et al. High Expression of the Ectonucleotidase CD39 on T Cells from the Inflamed Site Identifies Two Distinct Populations, One Regulatory and One Memory T Cell Population. *J Immunol.* 2010; 185(1):134-43.
23. Phillips CM, Perry IJ. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults? *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98(10):E1610-9.
24. Doumatey AP, Zhou J, Zhou M, Prieto DR, Rotimi CN, Adeyemo A. Proinflammatory and lipid biomarkers mediate metabolically healthy obesity: A proteomics study. *Obesity.* 2016; 24(6):1257-65.

25. Raghuraman S, Donkin I, Versteyhe S, Barrès R, Simar D. The Emerging Role of Epigenetics in Inflammation and Immunometabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2016; 27(11):782-795.
26. Teixeira AA de S, Lira FS, Pimentel GD, Oliveira de Souza C, Batatinha H, Biondo LA, et al. Aerobic Exercise Modulates the Free Fatty Acids and Inflammatory Response During Obesity and Cancer Cachexia. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2016;26(3):187-98.
27. Hong S, Dimitrov S, Pruitt C, Shaikh F, Beg N. Benefit of physical fitness against inflammation in obesity: Role of beta adrenergic receptors. *Brain Behav Immun*. 2014; 39:113-20.
28. Xiang L, Del Ben KS, Rehm KE, Marshall GD. Effects of acute stress-induced immunomodulation on Th1/Th2 cytokine and catecholamine receptor expression in human peripheral blood cells. *Neuropsychobiology*. 2011; 65(1):12-9.
29. Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Souza HA, Caperuto EC, Carnevali LC, et al. Endotoxin levels correlate positively with a sedentary lifestyle and negatively with highly trained subjects. *Lipids Health Dis*. 2010; 4;9:82.
30. Ten E, Martins C, Zulianello R, Bender A. Detectable levels of eHSP72 in plasma are associated with physical activity and antioxidant enzyme activity levels in hypertensive subjects. *Cell Stress Chaperones*. 2018;23(6):1319-1327.
31. Simar D, Malatesta D, Badiou S, Dupuy AM, Caillaud C. Physical activity modulates heat shock protein-72 expression and limits oxidative damage accumulation in a healthy elderly population aged 60-90 years. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2007; 62(12):1413-9.
32. Pedersen BK. The diseasome of physical inactivity - and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *Journal of Physiology*. 2009; 587(Pt 23):5559-68.
33. Duggal NA, Pollock RD, Lazarus NR, Harridge S, Lord JM. Major features of immunesenescence, including reduced thymic output, are ameliorated by high levels of physical activity in adulthood. *Aging Cell*. 2018; 17(2).
34. Pandolfi J, Ferraro A, Lerner M, Serrano JR, Dueck A, Fainboim L, et al. Purinergic signaling modulates human visceral adipose inflammatory responses: implications in metabolically unhealthy obesity. *J Leukoc Biol*. 2015; 97(5):941-949.
35. Pandolfi JB, Ferraro AA, Sananez I, Gancedo MC, Baz P, Billordo LA, et al. ATP-Induced Inflammation Drives Tissue-Resident Th17 Cells in Metabolically Unhealthy Obesity. *J Immunol*. 2016; 196(8):3287-96.

36. Handzlik MK, Shaw AJ, Dungey M, Bishop NC, Gleeson M. The influence of exercise training status on antigen-stimulated IL-10 production in whole blood culture and numbers of circulating regulatory T cells. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113(7):1839–48.

ANEXOS

Anexo I – Parecer de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa - UFCSPA

Anexo II – Normas de formatação para as revistas científicas

Seguindo as recomendações da coordenação do PPG-Ciências da Saúde, optou-se por inserir apenas o link para as normas online de cada revista.

Artigo I

Revista Oxidative Medicine and Cellular Longevity

<https://www.hindawi.com/journals/omcl/guidelines/>

Artigo II

Revista Journal of Cellular Biochemistry

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/10974644/homepage/forauthors.html>

Artigo III

Revista Metabolism – Clinical & Experimental

<https://www.elsevier.com/journals/metabolism/0026-0495/guide-for-authors>

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência aguda e crônica do exercício físico sobre a influência periférica de subpopulações de Linfócitos T: perfil inflamatório e fatores epigenéticos de indivíduos obesos

Pesquisador: PEDRO ROOSEVELT TORRES ROMAO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63282416.6.0000.5345

Instituição Proponente: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.973.432

Apresentação do Projeto:

O exercício físico apresenta importante papel imunoregulador, e estudos demonstram seu potencial em controlar a elevação de citocinas pró-inflamatórias e modificar o fenótipo de diversos leucócitos circulantes em indivíduos obesos (Gleeson et al., 2011). Neste sentido, há uma carência na literatura sobre a influência do exercício no fenótipo de sub-populações de Linfócitos T. Em especial, pouco se sabe sobre o potencial do exercício sobre as células Tregs (com importantes capacidades imunossupressivas).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral:

O foco do projeto consiste em avaliar o impacto do exercício físico na resposta inflamatória de indivíduos com sobrepeso-obesidade.

Objetivos específicos:

Subprojeto 1. Determinação da influência da capacidade cardiorrespiratória sobre a frequência periféricas de subpopulações de linfócitos T e do perfil inflamatório em indivíduos eutróficos e com obesidade grau 1 com diferentes níveis de consumo máximo de oxigênio.

Subprojeto 2. Efeitos agudos do exercício exaustivo sobre parâmetros epigenéticos e

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.973.432

níveis inflamatórios de indivíduos eutróficos e com sobrepeso-obesidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São contemplados os riscos no projeto e no TCLE como sendo moderados, podendo haver hematoma temporário devido à coleta de sangue, e em alguns casos desmaio. Em decorrência do exercício podem haver desconfortos temporários devido a eventos hipotensivos e lesões musculoesqueléticas de membros inferiores. Em ambos os casos será assegurado ao participante o atendimento, custeio de despesas e acompanhamento.

Os benefícios estão contemplados e dizem respeito ao participante receber informações sobre o peso corporal, peso de gordura e dados relativos à sua capacidade cardiorrespiratória, níveis de gorduras no sangue (triglicerídeos, colesterol, HDL e LDL) e também informações relativas ao seu sistema imune.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é considerada adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos são apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Arrumar alguns termos do TCLE, considerando que a linguagem deve ser clara e acessível (ergométrica, consumo de oxigênio, ventilação e produção de dióxido de carbono, HDL, LDL, síncope) e entregar uma versão corrigida, impressa, do TCLE no CEP para carimbo e assinatura da Coordenadora, para então este termo ser usado com os participantes.

Demais recomendações atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado. Por favor, atentar para a recomendação acima.

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado com recomendação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_847269.pdf	22/02/2017 20:11:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ppobesidade_2202.pdf	22/02/2017 20:11:26	Gilson Pires Dorneles	Aceito

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Continuação do Parecer: 1.973.432

Investigador	ppobesidade_2202.pdf	22/02/2017 20:11:26	Gilson Pires Dorneles	Aceito
Outros	COMPROMISSO.pdf	22/02/2017 20:11:00	Gilson Pires Dorneles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Novo.pdf	22/02/2017 20:10:33	Gilson Pires Dorneles	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	genetica_tox0001.pdf	22/12/2016 16:39:03	Gilson Pires Dorneles	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_gerencia0001.pdf	21/12/2016 21:25:04	Gilson Pires Dorneles	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_fisiot0001.pdf	21/12/2016 21:24:52	Gilson Pires Dorneles	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto2.pdf	21/12/2016 20:08:24	Gilson Pires Dorneles	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 20 de Março de 2017

Assinado por:
Julia Fernanda Semmelmann Pereira Lima
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro: Sarmento

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br