

# Influencia do Exercício Físico Leve e Moderado Agudo e após a Adaptação sobre a Proliferação de Linfocitos de Ratos

## Autores

---

Rodrigo Dias

## Orientador

---

Claudia Regina Cavaglieri

## Apoio Financeiro

---

Pibic

## 1. Introdução

---

Sabe-se que a intensidade e a duração dos exercícios agem de forma paradoxal nas respostas imunes, com os estudos demonstrando que: i) exercícios moderados e regulares estão associados com alterações benéficas no sistema imunológico acarretando diminuição na susceptibilidade à infecções (NIEMAN *et al.*, 2005; WEIDNER & SCHURR, 2003); e contrariamente ii) exercícios exaustivos responsáveis por imunossupressão transitória com aumentada susceptibilidade às mesmas (FRIMAN & WESSLÉN, 2000; NIEMAN & PEDERSEN, 1999).

Durante exercícios intensos ou moderados instala-se o quadro chamado de linfocitose, caracterizado pelo aumento da contagem linfocitária na circulação geral (NIEMAN *et al.*, 2005; NEMET *et al.*, 2004; GREEN *et al.*, 2002). Porém, seguinte a exercícios intensos ou prolongados, a concentração de linfócitos circulantes têm sido encontrada abaixo dos níveis basais, quadro este denominado linfopenia (MOOREN *et al.*, 2004; GREEN *et al.*, 2002; RONSEN *et al.*, 2002).

GREEN *et al.* (2002) evidenciam o exercício agudo como capaz de alterar a contagem e funcionalidade celular, podendo a linfopenia transitória estar associada a modulações na resposta imune por consequência da: i) redistribuição; ii) apoptose; assim como da iii) mitogênese celular. Estudos que avaliaram a relação capacidade proliferativa linfocitária e nível de aptidão física apresentaram resultados diversos com: i) nenhuma alteração (TVEDE *et al.*, 1991; NIEMAN *et al.*, 1995); assim como ii) aumento para indivíduos mais condicionados em comparação aos menos ativos (NIEMAN *et al.*, 2000; BAJ *et al.*, 1994). Outros trabalhos FRISINA *et al.*, (1994); SHINKAI *et al.*, (1992) têm demonstrado diminuída mitogênese celular T após exercício agudo em esteira e cicloergômetro por 30-60min.

Considerando que os linfonodos mesentéricos são responsáveis pelo armazenamento e posicionamento de linfócitos e que estes desempenham funções importantes no combate à infecções, torna-se vital a investigação da funcionalidade destas células.

## 2. Objetivos

---

Avaliar a capacidade mitogênica dos linfócitos teciduais provenientes dos linfonodos mesentéricos de ratos *in vitro*, após exercício agudo e sob adaptação nas intensidades leve e moderada.

### 3. Desenvolvimento

---

**Animais.** O experimento foi conduzido seguindo a política para pesquisas com animais experimentais do *American College of Sports Medicine*. Foram utilizados ratos machos *Wistar* (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*) com 2 meses e peso  $\pm 200$ g, sendo alocados em gaiolas coletivas mantidas a  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12/12h com água e ração *ad libitum*. Anteriormente ao protocolo os animais permaneceram 48h em adaptação.

**Exercício.** O modelo foi à natação, sendo realizado entre 14-17h em tanque com água a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Foi realizada uma única sessão de exercício sem qualquer tipo de carga adicional, correspondendo a uma intensidade abaixo do ponto de inflexão da curva do limiar de lactato (GOBATTO *et al.*, 2001; VOLTARELLI *et al.*, 2002), sendo os animais imediatamente mortos após o exercício para a análise das variáveis.

**Cultura celular** Após o isolamento, os linfócitos foram contados em *Câmara de Neubauer* usando-se o corante *Triplan Blue* e *Microscópio Óptico de Luz*. Posteriormente procedeu-se o plaqueamento da cultura na concentração inicial de  $1 \times 10^6$  células, sendo cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino. Na avaliação da mitogênese celular T e B foram utilizados respectivamente os mitógenos *concanavalin A* [ConA] e *lipopolyccharide* [LPS] diluídos em meio RPMI-1640. Após o plaqueamento, as células foram incubadas na estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

**Funcionalidade celular.** As amostras foram avaliadas 24, 48, 72 e 96h após o plaqueamento, obtendo-se uma curva de proliferação celular através de contagens das placas de cultura, com os resultados expressos em número de células  $\times 10^6$ .

#### **Apoio financeiro.**

PIBIC/CNPq e FAP/UNIMEP. **Tratamento estatístico. Testes ANOVA e t-Student com resultados expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$  EP) e significância de  $p \leq 0,05$ .** **Grupos experimentais.** i) controle – não exercitado [Con] e ii) exercitado com uma sessão aguda de exercício leve por 5min [AgL5].

### 4. Resultados

---

Recentemente NIEMAN *et al.*, (2005) observaram melhora temporária da mitogênese linfocitária via

*phytohaemagglutinin* [PHA] após 30min de caminhada moderada, utilizando-se de indivíduos adaptados. Similarmente SUGIURA *et al.*, (2000) também mostraram melhora na proliferação de esplenócitos de ratos via PHA e ConA após 8 semanas de treinamento em esteira. Em oposição FRISINA *et al.*, (1994); SHINKAI *et al.*, (1992) mostraram diminuição da mitogênese celular T via PHA, *poke weed mitogen* [PWM] e ConA após sessões agudas de 30-60min em esteira e cicloergômetro.

É bem conhecido que a contagem de células *Natural Killers* (NK) apresenta maior elevação na circulação geral após o exercício comparada às outras subclasses linfocitárias (NIEMAN *et al.*, 2005;

NIELSEN *et al.* (1997) demonstraram que 2/3 da linfocitose induzida pelo exercício compõem células do baço. Nesse sentido KAUFMAN *et al.*, (1994) observaram que os linfócitos circulantes apresentaram nenhuma alteração no percentual das células *T-citotóxicas* e *T-helper*, aumento e diminuição nas NK e B respectivamente; com os esplenócitos apresentando diminuição nas células *T-citotóxicas* e NK com nenhuma alteração nas *T-helper* e B. Assim, alterações similares com relação à redistribuição podem vir a ocorrer nos linfócitos mesentéricos e como esses tecidos linfóides, armazenam em sua maioria células T, nós hipotetizamos que a relação celular T e NK não se altere após as sessões propostas.

A cultura não estimulada com mitógeno do grupo Con apresentou aumentos nas amostras T48h, T72h e T96h em relação a Ti; sendo que o grupo AgL5 apresentou aumento em relação a Ti apenas em T96h. A hipótese levantada para a aumentada mitogênese nas culturas não estimuladas com mitógenos é possivelmente a existência de linfócitos já ativados antes do isolamento dos mesmos para o preparo da cultura. O fato de os linfonodos mesentéricos apresentarem maior concentração de células T em relação as B sustentam provavelmente a menor mitogênese linfocitária induzida pelo LPS comparada a ConA para ambos os grupos.

A queda na mitogênese do grupo AgL5 comparada ao Con via ConA na amostra T48h, demonstra que sessões curtíssimas de 5min, mesmo em intensidade leve retardaram a funcionalidade celular T, evidenciando um possível quadro imunossupressivo, sendo que FRISINA *et al.*, (1994); SHINKAI *et al.*, (1992) também observaram diminuída funcionalidade celular T após exercício agudo. Por outro lado, o LPS induziu uma resposta diferenciada para o mesmo grupo AgL5 comparado ao Con, já que as amostras T48h, T72h apresentaram diminuição que se tornou mais pronunciada na T96h, também podendo ser caracterizado um possível quadro imunossupressivo na mitogênese celular B, aparentemente com maior gravidade em relação aos células T, já que a estabilidade em relação ao Con não ocorreu em nenhum ponto da curva.

Segundo MALM (2004) a mitogênese linfocitária está reduzida nas primeiras horas após o exercício, sendo influenciada pelo cortisol. Contrariamente GREEN *et al.* (2003);

Uma nova interpretação fisiológica emergente é que o sistema imune tenta contrabalançar a queda na atividade linfóide pelo aumento da capacidade fagocitária (ORTEGA, 1994). É plausível sugerir baseado na prolongado efeito imunossupressivo celular B em comparação com a retardada manutenção da funcionalidade celular T, que mecanismos inerentes à própria imunidade adquirida tentem contrabalançar a aparente depressão da imunidade humoral priorizando a imunidade celular.

NEMET *et al.*, 2004). Concomitantemente NIELSEN & PEDERSEN, (1997); FRISINA *et al.*, (1994); SHINKAI *et al.*, (1992) sugerem que diminuições na mitogênese celular T são dependentes de alterações no número de células NK comparadas às outras subpopulações linfocitárias após o exercício, já que estas são menos sensíveis aos mitógenos. MITCHELL *et al.* (1998) evidenciam a proliferação linfocitária de humanos como relacionada a mecanismos independentes dos níveis séricos de cortisol. Como os protocolos de exercício empregados nesses estudos não foram agudos, tais resultados podem não se aplicar aos do presente estudo.

## **5. Considerações Finais**

---

O ponto mais importante do estudo foi que exercícios realizados agudamente na intensidade leve, mesmo que por períodos curtíssimos de 5min, foram capazes de modular a funcionalidade dos linfócitos mesentéricos de ratos. Portanto, a prescrição de exercícios nessas condições, necessita ter seus efeitos devidamente esclarecidos, pois podem induzir alterações na resposta imune adquirida, sendo ainda prematuro associar tais alterações com uma aumentada susceptibilidade à infecções. Assim, a relevância e o significado clínico da modulação na resposta mitogênica linfocitária após sessões curtíssimas de 5min ainda que em intensidade leve, precisam ser mais bem esclarecidos para o melhor entendimento da tríade: i) exercício; ii) respostas imunológicas e iii) susceptibilidade à infecções.

## Referências Bibliográficas

---

BAJ Z.; KANTORSKI J.; MAJEWSKA E.; ZEMAN K.; POKOCA L.; FORNALCZYK E.; TCHORZEWSKI H.; SULOWSKA Z.; LEWICKI R., Immunological status of competitive cyclists before and after the training season. **International Journal of Sports Medicine**, 15: 319-324, 1994.

FRISINA J. P.; GAUDIERI S.; CABLE T.; KEAST D.; PALMER T. N., Effects of acute exercise on lymphocytes subsets and metabolic activity. **International Journal of Sports Medicine**, 15(1): 36-41, 1994.

FRIMAN G. & WESSLÉN L., Infections and exercise in high-performance athletes. **Immunology and Cell Biology**, 78(5): 510-522, 2000.

GOBATTO C. A.; MELLO M. A. R.; SIBUYA C. Y.; AZEVEDO J. R. M.; SANTOS L. A. S.; KOKUBUN E., Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 130: 21-27, 2001.

GREEN K. J.; ROWBOTTOM D. G., MACKINNON L. T., Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. **Journal of Applied Physiology**, 92(6): 2390-2395, 2002.

GREEN K. J.; CROAKER S. J.; ROWBOTTOM D. G., Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. **Journal of Applied Physiology**, 95(3): 1216-1223, 2003.

KAUFMAN J. C.; HARRIS T. J.; HIGGINS J.; MAISEL A. S., Exercise-induced enhancement of immune function in the rat. **Circulation**, 90(1): 525-532, 1994.

MALM C., Exercise immunology: The current state of man and mouse. **Sports Medicine**, 34(9): 555-566, 2004.

MITCHELL J. B.; PIZZA F. X.; PAQUET A.; DAVIS B. J.; FORREST M. B.; BRAUN W. A., Influence of carbohydrate status on immune responses before and after endurance exercise. **Journal of Applied Physiology**, 84(6): 1917-1925, 1998.

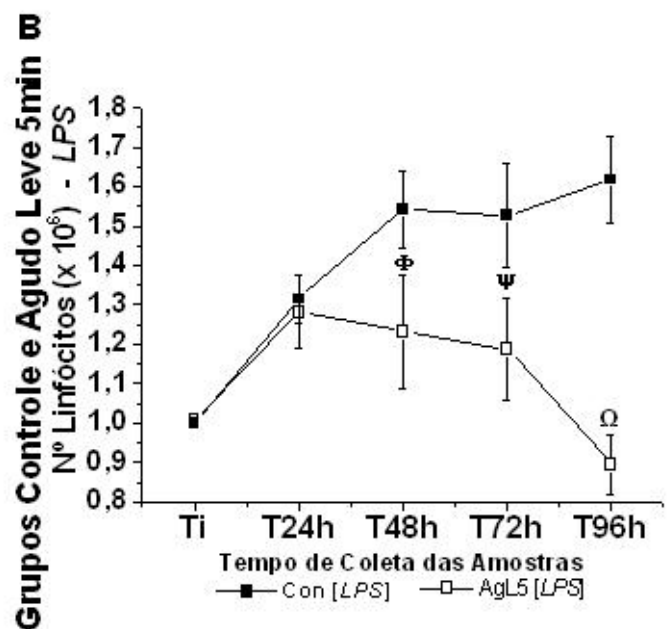
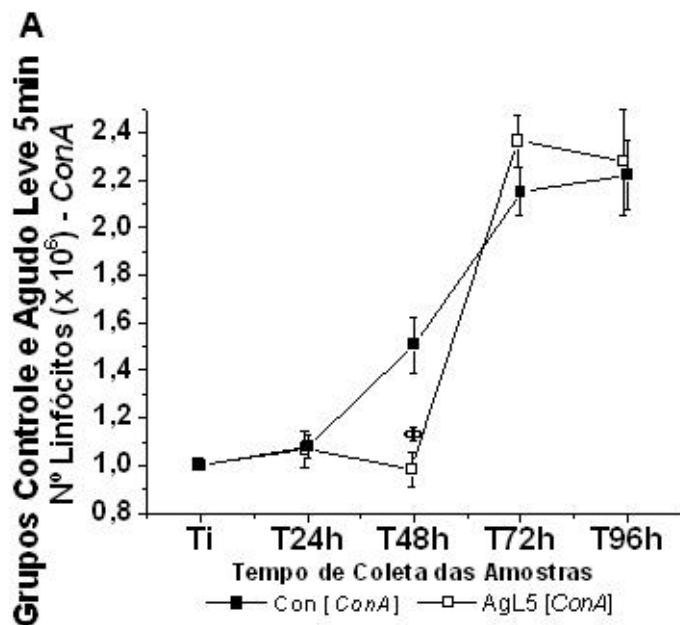
MOOREN F. C.; LECHTERMANN A.; VÖLKER K., Exercise-Induced Apoptosis of Lymphocytes Depends on Training Status. **Medicine in Science Sports Exercise**, 36(9):1476-1483, 2004.

NEMET D.; MILLS P. J.; COOPER D. M., Effect of intense wrestling exercise on leucocytes and adhesion molecules in adolescent boys. **British Journal of Sports Medicine**, 38(2): 154-158, 2004.

- NIELSEN H. B.; SECHER N. H.; KRISTENSEN J. H.; CHRISTENSEN N. J.; ESPERSEN K.; PEDERSEN B. K., Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 272: R1847-R1852, 1997.
- NIELSEN H. B. & PEDERSEN B. K., Lymphocyte proliferation in response to exercise. **European Journal of Applied Physiology**, 75(5):375-379, 1997.
- NIEMAN D.C.; BUCKLEY K. S.; HENSON D. A.; WARREN B. J.; SUTTLES J.; AHLE J. C.; SIMANDLE S.; FAGOAGA O. R.; NEHLSSEN-CANNARELLA S. L., Immune function in marathon runners versus sedentary controls. **Medicine in Science Sports Exercise**, 27:986-992, 1995.
- NIEMAN D. C.; PEDERSEN B. K., Exercise and immune function: recent developments. **Sports Medicine**, 27(2): 73-80, 1999.
- NIEMAN D.C.; NEHLSSEN-CANNARELLA S. L.; FAGOAGA O. R.; HENSON D. A.; SHANNON M.; HJERTMAN J. M. E.; SCHMITT R. L.; BOLTON M. R.; AUSTIN M. D.; SCHILLING B. K.; THORPE R., Immune function in female elite rowers and no-athletes. **British Journal of Sports Medicine**, 34(3):181-187, 2000.
- NIEMAN D. C.; HENSON D. A.; AUSTIN M. D.; BROWN V. A., Immune Response to a 30-Minute Walk. **Medicine in Science Sports Exercise**, 37(1):57-62, 2005.
- ORTEGA E., Influence of exercise on phagocytosis. **International Journal of Sports Medicine**, S172-S178, 1994.
- RONSEN O.; KJELDEN-KRAGH J.; HAUG E.; BAHR R.; PEDERSEN B. K., Recovery time affects immunoendocrine responses to a second bout of endurance exercise. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, 283(6): C1612-C1620, 2002.
- SHINKAI S.; SHORE S.; SHEK P. N.; SHEPHARD R. J., Acute exercise and immune function. Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. **International Journal of Sports Medicine**, 13(6): 452-461, 1992.
- SUGIURA H.; SUGIURA H.; NISHIDA H.; INABA R.; MIRBOD S. M.; IWATA H., Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. **Acta Physiol Scand**, 168: 413-420, 2000.
- TVEDE N.; STEENBERG J.; BASLUND B.; HALKJAER-KRISTENSEN J.; PEDERSEN B. K., Cellular immunity in highly trained elite racing cyclists during periods of training with high and low intensity. **Scand J Med Sci Sports**, 1: 163-91666, 1991.
- VOLTARELLI F. A.; GOBATTO C. A.; MELLO M. A. R., Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 35(11): 1389-1394, 2002.
- WEIDNER T.; SCHURR T., Effect of exercise on upper respiratory tract infection in sedentary subjects. **British Journal of Sports Medicine**, 37(4): 304-306, 2003.

## Anexos

---



**Figura 1.** Curvas de proliferação celular *in vitro* de ratos machos do grupo Controle (Con;  $n=6$ ) e Agudo Leve 5min (AgL5;  $n=6$ ): (A) via ConA e (B) via LPS; valores exibidos pela média ( $\pm$  EP) com  $p \leq 0,05$ ; quando estatisticamente significantes: (\*) para o grupo AgL5 [ConA] em relação ao Con [ConA] e para o grupo AgL5 [LPS] em relação ao Con [LPS] para as amostras nos tempos T24h, ( $\Phi$ ) T48h, ( $\Psi$ ) T72h e ( $\Omega$ ) T96h.

**Tabela 1.** Curvas de proliferação celular *in vitro* via *ConA* e *LPS* de ratos machos do grupo Controle (Con; *n*=6) e Agudo Leve 5min (AgL5; *n*=6); valores exibidos pela média ( $\pm$  EP) com  $p \leq 0,05$ ; quando estatisticamente significantes: (\*) para as amostras nos tempos T24h, T48h, T72h e T96h em relação a Ti; ( $\Phi$ ) T48h, T72h e T96h em relação a T24h; ( $\Psi$ ) T72h e T96h em relação a T48h; ( $\Omega$ ) T96h em relação a T72h; variação relativa [%], sendo (sv) sem variação e ( $\Delta$ ) com variação estatisticamente significativa.

Grupos Analisados	Ti	T24h	T48h	T72h	T96h
Con Sem Mitógeno	1 $\pm$ 0	1,14 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,05 *	1,31 $\pm$ 0,08 *	1,13 $\pm$ 0,05 *
Variação relativa [%] a Ti	—	sv	$\Delta$ +15,67	$\Delta$ +30,83	$\Delta$ +12,83
AgL5 Sem Mitógeno	1 $\pm$ 0	1,14 $\pm$ 0,08	1,16 $\pm$ 0,08	1,11 $\pm$ 0,1	1,23 $\pm$ 0,06 *
Variação relativa [%] a Ti	—	sv	sv	sv	$\Delta$ +23,33
Con [ConA]	1 $\pm$ 0	1,08 $\pm$ 0,05	1,51 $\pm$ 0,12 * $\Phi$	2,15 $\pm$ 0,1 * $\Phi$ $\Psi$	2,22 $\pm$ 0,15* $\Phi$ $\Psi$
Variação relativa [%] a Ti	—	sv	$\Delta$ +50,67	$\Delta$ +115,17	$\Delta$ +122
Variação relativa [%] a T24h	—	—	$\Delta$ +39,51	$\Delta$ +99,23	$\Delta$ +105,55
Variação relativa [%] a T48h	—	—	—	$\Delta$ +42,81	$\Delta$ +47,34
AgL5 [ConA]	1 $\pm$ 0	1,06 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,07	2,26 $\pm$ 0,1 * $\Phi$ $\Psi$	2,18 $\pm$ 0,21* $\Phi$ $\Psi$
Variação relativa [%] a Ti	—	sv	sv	$\Delta$ +125,67	$\Delta$ +117,67
Variação relativa [%] a T24h	—	—	sv	$\Delta$ +113,23	$\Delta$ +105,67
Variação relativa [%] a T48h	—	—	—	$\Delta$ +130,27	$\Delta$ +122,11
Con [LPS]	1 $\pm$ 0	1,31 $\pm$ 0,06 *	1,54 $\pm$ 0,1 *	1,53 $\pm$ 0,13 *	1,62 $\pm$ 0,11 * $\Phi$
Variação relativa [%] a Ti	—	$\Delta$ +31,5	$\Delta$ +54,17	$\Delta$ +52,67	$\Delta$ +61,83
Variação relativa [%] a T24h	—	—	sv	sv	$\Delta$ +23,07
AgL5 [LPS]	1 $\pm$ 0	1,22 $\pm$ 0,07 *	1,18 $\pm$ 0,12	1,15 $\pm$ 0,1	0,91 $\pm$ 0,06 $\Phi$
Variação relativa [%] a Ti	—	$\Delta$ +22,5	sv	sv	sv
Variação relativa [%] a T24h	—	—	sv	sv	$\Delta$ -25,85