

# Efeito da atividade física sobre a funcionalidade de linfócitos de ratos

## Autores

---

Cláudia Regina Cavaglieri  
Adrienne Christine Palanch  
Rozangela Verlengia  
Jonato Prestes  
Anelena Bueno Frollini  
Rodrigo Dias  
Felipe Fedrizzi Donatto  
Clilton Krauss de Oliveira Ferreira

## Apoio Financeiro

---

Fap

## 1. Introdução

---

Vários estudos relatam que o exercício físico afeta a competência do sistema imunológico, incluindo o tráfico de células induzido por hormônios e a influência direta dos hormônios do estresse, prostaglandinas, citocinas e outros fatores (SUZUKI et al., 2000). Porém, estes efeitos variam de acordo com o tempo e intensidade do exercício físico. Estudos epidemiológicos demonstram uma relação positiva entre estilo de vida ativo, prática de exercícios regulares e aumento da resistência às infecções do trato respiratório superior (IRTS)(MALM, 2006). Por outro lado, têm se relacionado treinamentos de alto volume e intensidade, com uma maior susceptibilidade à IRTS (NIEMAN & PEDERSEN, 1999, NIEMAN, 1994).

O risco de se contrair IRTS pode se duplicar para pessoas sedentárias que se submetem a exercícios físicos extremos, em razão de alterações negativas no sistema imune provocadas tanto pela liberação dos hormônios do estresse, como pela linfocitopenia pós-exercício; pela supressão das células NK "Natural Killer" (MARS et al., 1998) e pela redução da IgA salivar (TOMASI, 1992). Assim, o exercício pode, paradoxalmente, tanto promover melhora das respostas imunes, como prejudicar estas respostas. Com isso, a ponte que relaciona exercício físico à qualidade de vida vem adquirindo um novo formato, considerando o exercício como um fator positivo ou negativo a saúde dependendo de como é aplicado.

O número de leucócitos totais aumenta após sessões agudas de exercício, em virtude do aumento do número de linfócitos, sendo acompanhado por valores abaixo das condições de repouso, após exercícios intensos e de longa duração (PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ, 2000). Este fato deve estar relacionado a influência do cortisol (MALM, 2004) que diminui a resposta imune adquirida.

Com relação as citocinas, estas são proteínas que auxiliam no controle e são mediadores das interações entre as células envolvidas nas respostas imunes. Neste sentido, o exercício físico pode induzir liberação seqüencial de citocinas próinflamatórias (TNF-alfa; e IL-6), de citocinas antinflamatórias (IL-10 e IL1ra) e IL-2, produzida por linfócitos T e células NK. Alguns estudos ainda demonstram que o exercício altera a concentração de citocinas circulantes (NEMET et al, 2003).

## 2. Objetivos

---

Investigar as respostas ao exercício físico agudo e após adaptação nas intensidades leve e moderada, sobre o número e proliferação de linfócitos teciduais e circulantes; e concentração sérica de citocinas circulantes (IL-2, IL-6 e TNF-alfa;) de ratos.

## 3. Desenvolvimento

---

**3.1 Animais e Exercício Físico:** Ratos machos *Wistar* (*Rathus norvegicus* var, *albinus*, *Rodentia*, *Mamalia*), com 2 meses e peso  $\pm$  200 g, obtidos do Biotério Central da UNIMEP. Os animais receberam água e alimentação ad libitum, foram mantidos em gaiolas coletivas em temperatura constante de  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12/12 horas com luz acesa a partir das 6h. O modelo de exercício foi à natação, estando a temperatura da água a  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sendo o protocolo realizado entre 14-17h. Para o exercício em intensidade moderada, cargas com 5% do peso corporal dos animais foram acopladas em suas regiões dorsais.

**3.2 Grupos Experimentais:** a) controle; b) exercício agudo leve - 5' (AGL5), 10' (AGL10), 15' (AGL15) e exaustão (EXL); c) exercício agudo moderado - 5' (AGM5), 10' (AGM10), 15' (AGM15) e exaustão (EXM); d) agudo sham (AGS) e adaptado sham (ADS); e) adaptado ao exercício – leve (ADL) e moderado (ADM).

**3.3 Parâmetros Leucocitários:** Após o exercício, os animais foram decapitados analisando-se: 1) Leucometria, 2) Leucograma Diferencial (ênfase em linfócitos circulantes), 3) Número Linfócitos Mesentéricos; sendo utilizado: Câmara de Neubauer, Microscópio Óptico de Luz, Lâminas para esfregaço sanguíneo e aparelho LEUCOTRON TP, 4) Proliferação de linfócitos Teciduais utilizando os mitógenos Concanavalina A (ConA) e Lipopolissacarídeo (LPS) em meio de cultura com RPMI.

**3.4 Dosagem de Citocinas Séricas:** A dosagem das citocinas (IL-2, IL-6 e TNF-alfa) foi feita a partir do soro sanguíneo e determinada pelo método ELISA, utilizando-se o Kit BioSource International (CAVAGLIERI et al., 2003).

**3.5 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 CO<sub>2</sub> a 37°C.

**3.6 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 x 10<sup>6</sup>.

**3.7 Estatística:** Testes ANOVA e t-Student; resultados expressos pela média ± erro sendo estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

## 4. Resultados

---

Os resultados obtidos foram: 1) Leucometria: aumento em todos os grupos exercitados; 2) Leucograma Diferencial (% Linfócitos): aumento nos grupos AGL15, AGS, ADS, ADL, AGM5, AGM10 e ADM; nenhuma alteração nos grupos AGL10, EXL, AGM15 e EXM; diminuição apenas no grupo AGL5; 3) número de Linfócitos teciduais: aumento nos grupos AGL5, AGS, ADS, AGM5, AGM10 e AGM15; diminuição nos grupos EXL, ADL e ADM; nenhuma alteração nos grupos AGL10, AGL15 e EXM.

Os efeitos do exercício físico sobre o aumento no número de leucócitos circulantes podem ser mediados pela ativação do sistema nervoso simpático (SNS) (MILLS et al., 1999); sendo que no indivíduo destreinado ou com baixa aptidão física foi observado aumento na concentração plasmática de noradrenalina comparado com o indivíduo treinado (SOTHMANN et al., 1991) e por alterações na hemodinâmica (GABRIEL & KINDERMANN, 1998). Assim, provavelmente os animais que se exercitaram de forma aguda, apresentaram maior ativação do SNS, promovendo aumento na secreção de catecolaminas, induzindo leucocitose e linfocitose temporária (ORTEGA et al., 2003). Ao passo que, os grupos adaptados são menos sensíveis aos efeitos estressores do exercício, apresentando conseqüentemente, uma menor secreção de catecolaminas e cortisol.

Observamos que o volume influencia o número de linfócitos teciduais, tanto no exercício agudo e na exaustão em intensidade leve, como nos grupos adaptados, evidenciando um desequilíbrio entre as populações circulantes e teciduais. Segundo PEDERSEN & HOFFMAN-GOETZ (2000), concentrações plasmáticas de cortisol aumentam somente em exercícios de longa duração, ao passo que são observadas poucas alterações até 1h de exercício. Portanto, somente sessões de longa duração de exercício poderiam induzir linfopenia, o que justificaria os nossos resultados, onde observamos uma diminuição no número de linfócitos teciduais nos grupos ADL, ADM e EXL, sendo que este último permaneceu em média 7 h nadando.

Sugere-se que uma porcentagem considerável de linfócitos sai dos tecidos para a circulação, não retornando para os mesmos. Isto pode ocorrer devido ao aumento do fluxo sanguíneo provocado pelas catecolaminas liberadas no exercício e à estimulação da imunidade adquirida pela inata, promovendo o redirecionamento de linfócitos para a musculatura esquelética.

Em todos os grupos experimentais, não observamos alteração significativa na concentração sérica de IL-2. Entretanto, observamos aumento na concentração plasmática de IL-6 no grupo EXL em comparação com o controle, AGL5 e AGL15. Sendo que, a concentração de IL-6 foi menor nos grupos ADL e EXM, em relação ao grupo EXL (Figura 1). Quanto ao TNF-alfa, observamos uma diminuição significativa nos grupos ADL e ADM, AGM5, AGM15, EXM, em relação ao grupo controle. Também ocorreu uma redução no grupo AGM15 quando comparado ao grupo AGL15.

MCFARLIN et al. (2004), realizaram um estudo com homens (18-26 anos), que exercitaram uma sessão de uma hora de bicicleta ergométrica com 75% a 80% do VO<sub>2</sub>máx. Eles observaram que não houve alteração significativa na IL-2 quando não foi realizada a ingestão de carboidratos, concordando com nossos resultados.

As concentrações plasmáticas de IL-6 aumentadas após o exercício foram associadas à lesão muscular (BRUUNSGAARD et al., 1997). No entanto, estudos recentes relatam que a IL-6 pode aumentar mesmo na ausência de lesão no tecido muscular (KELLER et al., 2001), dependendo da intensidade e da duração da atividade.

Um estudo com uma sessão de polo aquático, com duração de uma hora e meia demonstrou uma redução de 20% sobre nas concentrações de TNF-alfa; (NEMET et al, 2003), semelhante ao que observamos. No entanto, outros estudos indicam que não há mudanças na concentração desta citocina (SUZUKI et al, 2000).

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 (Tabela 1). 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 (Figura 1).

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

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

---

Estes resultados sugerem que o exercício físico agudo nas intensidades leve e moderada e após adaptação, na intensidade leve e moderada modularam o número de linfócitos, tanto dos linfonodos mesentéricos, como os circulantes, podendo induzir alterações na resposta imune.

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.

Portanto a prescrição de exercícios físicos com intensidades diferentes, incluindo a intensidade leve, precisam ter seus efeitos devidamente esclarecidos, pois dependendo do volume, poderão induzir alterações na resposta imune adquirida, sendo ainda prematuro associar essas alterações com uma aumentada susceptibilidade à infecções.

## Referências Bibliográficas

---

BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T.L.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J. Physiol. Lond.*, 499: 833-841, 1997.

CAVAGLIERI, C.R.; NISHIYAMA, A.; FERNANDES, L.C.; CURI, R.; MILES, E.A.; CALDER, P.C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences*, 73: 1683–1690, 2003.

GABRIEL H.H. & KINDERMANN W., Adhesion molecules during immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol.*, 76: 512-23, 1998.

KELLER, C.; STEENSBERG, A.; PILEGAARD, H.; OSADA, T.; SALTIN, B.; PEDERSEN, B.K.; NEUFER, P.D. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J.*, 15:2748-2750, 2001.

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

MALM, C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 16:4-6, 2006.

MARS M.; GOVENDER A.; WESTON A.; NAICKER V.; CHUTURGOON A., High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis?. *Biochem Biophys Res Commun*, 249: 366-370, 1998.

McFARLIN, B.K.; FLYNN, M.G.; STEWART, L.K.; TIMMERMAN, K.L. Carbohydrate intake during endurance exercise increases natural Killer cell responsiveness to IL-2. *J Appl Physiol.*, 96: 271-275, 2004.

MILLS P. J.; REHMAN J.; ZIEGLER M.G.; CARTER S. M.; DIMSDALE J.E.; MAISEL A.S., Nonselective beta blockade attenuates the recruitment of CD62L(-)T lymphocytes following exercise. *Eur J Appl Physiol.*, 79: 531-534, 1999.

NEMET, D.; ROSE-GOTTRON, C.M.; MILLS, P.J.; COOPER, D.M. Effect of Water Polo Practice on Cytokines, Growth Mediators, and Leukocytes in Girls. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35(2): 356-363, 2003.

NIEMAN, D.C.; PEDERSEN B.K. Exercise and immune function: recent developments. *Sports Med.*, 27(2): 73-80, 1999.

ORTEGA, E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: Physiological implications. *Exercise Immunology Review*. 9:70-93, 2003.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration and Adaptation. *Physiol Rev.*, 80: 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; STEENSBERG, A.; SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol.*, 536: 329-337, 2001.

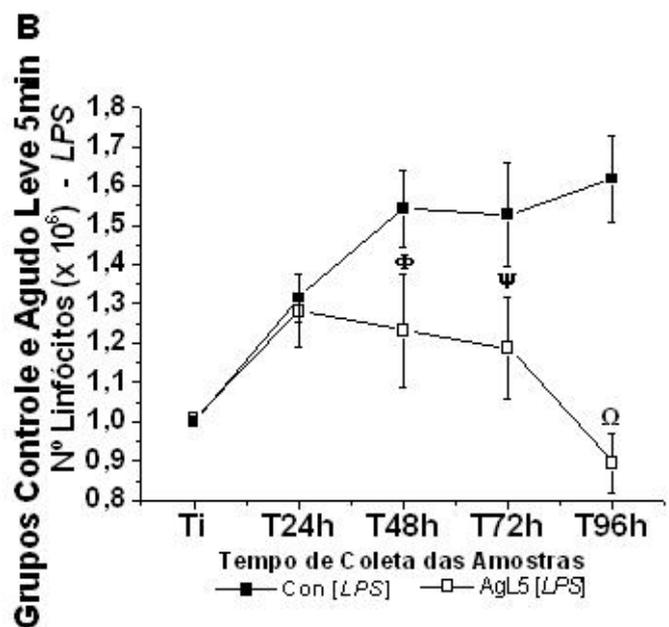
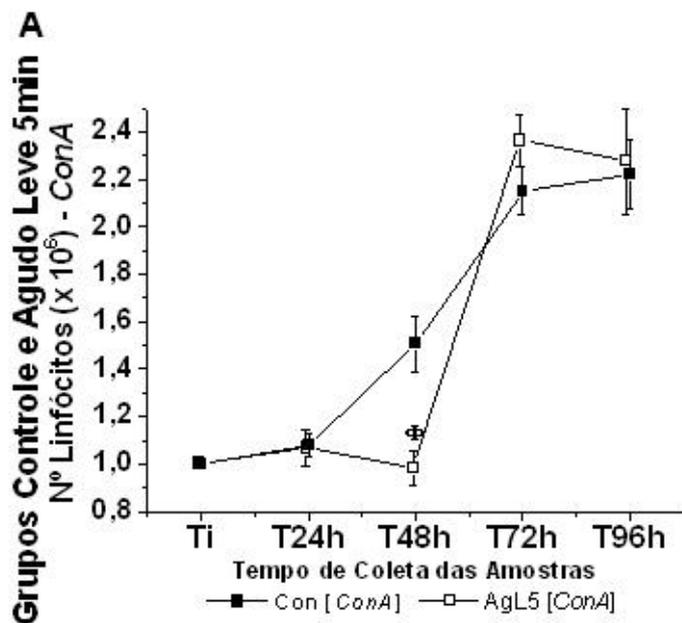
SOTHMANN M.S.; HART B. A.; HORN T.S., Plasma catecholamine response to acute psychological stress in humans: relation to aerobic fitness and exercise training. *Med Sci Sports Exerc.*, 23: 860-867, 1991.

SUZUKI, K.; YAMADA, M.; KURAKAKE, S.; OKAMURA, N.; YAMAYA, K.; LIU, Q.; KUDOH, S.; KOWATARI, K.; NAKAJI, S.; SUGAWARA, K. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 81: 281-287, 2000.

TOMASI T. B., The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol Today*, 13: 416-18, 1992.

## **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, (Φ) T48h, (Ψ) T72h e (Ω) 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 significante.

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 [ <i>ConA</i> ]	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 [ <i>ConA</i> ]	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 [ <i>LPS</i> ]	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 [ <i>LPS</i> ]	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