

Influencia do Exercício Físico Leve e Moderado Agudo e após a Adaptação sobre a Produção de Citocinas em Cultura de Linfócitos de Ratos

Autores

Anelena Bueno Frollini

Orientador

Claudia Regina Cavaglieri

Apoio Financeiro

Pibic

1. Introdução

As funções imunes sabidamente exercem importante papel nos mecanismos de defesa contra antígenos. Diversos estudos têm sido conduzidos na área da imunologia do exercício (MACKINNON, 1998; MALM, 2004; NIEMAN, 1997; PEDERSEN *et al.*, 1998b; WHITE *et al.*, 2006). A intensidade, duração e a frequência do exercício exercem papel chave na determinação das respostas imunes a um esforço, podendo aumentar ou reduzir tal função (MATTHEWS *et al.*, 2002; NIEMAN, 1994; ZALDIVAR *et al.*, 2006).

No entanto, os mecanismos envolvidos neste processo não foram ainda completamente elucidados. Estes efeitos podem ocorrer devido à ação de hormônios do estresse, interação neuro-endócrina, fatores hematológicos, nutricionais, diminuição dos níveis circulantes de glutamina e liberação de citocinas (SHEPARD, 1998).

As Citocinas são hormônios protéicos mediadores e reguladores de respostas imunes e inflamatórias, produzidas pelas próprias células de defesa, durante as fases de ativação da imunidade inata e específica. Estudos recentes (DHABHAR, 2000; MALM, 2004) têm concluído que a imunidade inata aumenta com atividade física aguda, protegendo o organismo de infecções.

Curiosamente, a interleucina-2 (IL-2) é uma das citocinas que tem sido utilizada como estimulante dos linfócitos e ainda das células “natural killer” (NK) (NIELSEN e PEDERSEN, 1997). Contudo, a IL-2 por sua vez, é sintetizada pelos linfócitos T citotóxicos e posteriormente elas irão agir na proliferação e ativação dos linfócitos T por CD4 e CD6, objetivando a morte viral juntamente com as células NK que foram estimuladas pelo IFN- γ (NAOUM, 2001). Além disso, a IL-2 ativa os monócitos/macrófagos e a liberação de outras citocinas como TNF- α e IFN- γ (ANDERSON *et al.*, 1992). Vale também destacar que o exercício demonstrou suprimir a função dos linfócitos T e NK, possivelmente assim, comprometendo a produção de citocinas a partir destas células (STARKIE *et al.*, 2001).

Este trabalho visa investigar as alterações na produção de citocinas em cultura de linfócitos, que interferem

com a resposta do sistema imunológico. Estas citocinas podem estimular ou inibir a proliferação e/ou diferenciação dos subtipos de linfócitos, as quais poderiam modular positiva ou negativamente o sistema imune adquirido dos praticantes de exercício físico. Dessa forma, é fundamental esclarecermos os efeitos do exercício físico sobre o sistema imunológico, para que possamos ter maior segurança na prescrição de exercícios físicos.

2. Objetivos

O objetivo deste estudo visa investigar os efeitos do exercício físico agudo em intensidade leve sobre a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-6 e TNF- α em cultura de linfócitos de ratos, usando como modelo de exercício físico a natação.

3. Desenvolvimento

1. Metodologia

Ratos da linhagem Wistar, com 2 meses de idade, peso médio de 200 g e foram obtidos do biotério central da UNIMEP. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas com 5 animais cada, ambiente com temperatura constante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Antes de iniciar o período experimental, os animais permaneceram por 48 horas em adaptação às condições do biotério de pesquisa.

Os animais foram divididos em: grupo não exercitado (sem adição de mitógeno) e grupo agudo 5 minutos na intensidade leve (com e sem adição de mitógeno). Para o grupo não exercitado realizamos uma curva de proliferação nos seguintes tempos: 18horas, 24horas, 36horas e 48horas. Já o grupo exercitado foi submetido ao exercício físico apenas uma vez, os quais não utilizaram cargas adicionais em seu dorso, sendo as amostras coletadas em 48horas de proliferação.

O modelo de exercício físico escolhido foi a natação, realizada sempre em um tanque com a temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ no período da tarde.

Após a decaptação dos animais, os linfócitos dos linfonodos mesentéricos foram retirados e colocados em cultura, acrescido ou não de mitógeno (lipopolissacarídeo - LPS ou concanavalina A - ConA). Depois do período de incubação as amostras foram centrifugadas e armazenadas em -70°C e posteriormente dosadas pelo método ELISA, seguindo as especificações correspondentes ao Kit (BD OptEIA[™] obtido da Pharmingen) (Cavaglieri *et al.*,2003).

2. Análise Estatística

Α ανάλυση εστατιστικά φοι ρεαλιζαδα χομ α απλιχα| ©ο δο τεστε ANOVA, σεγυιδο δο τεστε τ-Στυδεντ (π* ≤ 0,05), σενδο οσ ρεσυλταδοσ εξπρεσσοσ πελα μ|δια ± ερρο παδρ©ο δα μ|δια. Παρα οσ χ|χυλοσ φοι υτιλιζαδο ο σοφτωαρε MIXPOXAA OPIGIN ζ.6 (1999).

4. Resultados

As citocinas são como uma rede de ligação para auxiliar na regulação da sinalização das respostas imunes inatas e específicas. Existem diversas explicações possíveis para a variabilidade dos resultados na responsividade das citocinas pró e anti-inflamatórias em relação ao exercício (PEDERSEN *et al.*, 1998a). Primeiro, o tipo de atividade física, a intensidade e duração do exercício podem afetar o perfil das citocinas. Segundo, a especificidade e a sensibilidade dos kits utilizados em estudos com exercício físico podem explicar as variações nos resultados (PEDERSEN, 2000). Outro fator de grande relevância que pode alterar o resultado das citocinas quando estamos nos referindo a produção *in vitro* são o tempo de coleta, os tipos e as diferentes concentrações de mitógenos utilizados (NIELSEN e PEDERSEN, 1997).

Os linfócitos T estão entre as células que são responsáveis pela síntese de citocinas. Algumas delas irão estimular a proliferação e até a ativação de linfócitos, que por sua vez irão produzir novas citocinas. A estimulação pelos mitógenos provoca maior liberação dessas citocinas (ABBAS *et al.*, 2003).

Sabe-se que quando não utilizamos agentes mitogênicos para estimular a proliferação de células, provavelmente os valores obtidos no início da incubação, tanto na contagem das células quanto na análise da produção de citocinas, não sofrerão grandes alterações. Isso pode ser observado nos nossos resultados da curva de proliferação nas citocinas (figura 1) analisadas, as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Pode também ser observado na figura 2 diferenças estatisticamente significativas nos grupos que foram induzidos por mitógenos em relação aos que não foram, com isso podemos sustentar a hipótese da maior proliferação nas amostras que foram induzidas por mitógenos.

Além desta possibilidade colocada acima, a não realização de exercício físico pode ter influenciado nos resultados da curva de proliferação, já que ele pode modular a produção de citocinas (STARKIE *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2006).

Quando a produção de citocina é muito baixa, muitas vezes os valores obtidos pelo ELISA torna-se indetectável (figura 1), ou seja, os valores são negativos, podendo então concluir que esta citocina está em concentração quase que inexistente (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2003; ZALDIVAR *et al.*, 2006). A IL-6 e o TNF-α apresentam concentrações maiores em relação a IL-4 e a IL-10 (figura 1), como eles não foram submetidos ao exercício, provavelmente os animais estavam com algum tipo de inflamação, o que pode ter ocasionado em maiores concentrações das citocinas pró-inflamatórias.

Em relação ao grupo exercitado por 5 minutos em intensidade leve podemos observar aumento estatisticamente significativo nas amostras estimuladas por LPS e ConA em relação as amostras não estimuladas por mitógenos. Houve também aumento estatisticamente significativo nas amostras que continham ConA quando relacionada com as que continham LPS. Esses resultados puderam ser observados em todas as citocinas analisadas (figura 2).

Um dos mecanismos propostos para esclarecer esses resultados é que o ConA estimula primordialmente os linfócitos T e o LPS estimula preferencialmente os linfócitos B (NIELSEN e PEDERSEN, 1997). Portanto, o aumento nas amostras que continham ConA se deve ao fato de haver maior proliferação de linfócitos T, os

quais têm como uma de suas funções secretar citocinas.

Atualmente, sabe-se que o exercício físico não tem apenas respostas inflamatórias, existem estudos que relatam que ocorre um balanço entre os mediadores das citocinas pró e anti-inflamatórias em resposta ao exercício (OSTROWSKI *et al.*, 1999; ZALDIVAR *et al.*, 2006).

Portanto, outros estudos serão necessários para esclarecer as possíveis respostas sobre a produção de citocinas *in vitro*, aliada a um exercício físico específico.

5. Considerações Finais

Estes resultados sugeriram que as respostas proliferativas estão intimamente ligadas ao tipo e concentração dos mitogênicos utilizados, além da duração da proliferação e ao exercício realizado. Contudo, torna-se necessário que outros estudos sejam realizados para elucidar os efeitos de um exercício agudo específico e suas possíveis respostas sobre a produção de citocinas em cultura de linfócitos, para que possamos ter maior segurança na prescrição de exercícios físicos.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PODER, J.S. Citocinas. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap.11, p.235-240, 2003.

ANDERSON, P.M.; OCHOA, A.C.; RAMSAY, N.K.; HASZ, D.; WEISDORF, D. Anti-CD3+ interleukin-2 stimulation of marrow and blood: comparison of proliferation and cytotoxicity. Blood, 80: 1846, 1992.

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 Sci.**, 73(13): 1683-90, 2003.

DHABHAR, F.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. **Ann N Y Acad Sci.**, 917: 876-93, 2000.

MACKINNON, L.T. Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. **Int J Sports Med.**, 19:S205-S211, 1998.

MALM, C. Exercise Immunology: the current state of man and mouse. **Sports Med.**, 34: 555-566, 2004.

MATTHEWS, C.E., OCKENE, I.S., FREEDSON, P.S., ROSAL, M.C., MERRIAM, P.A.; HEBERT, J.R. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. **Med Sci Sports Exerc.**, 34: 1242-1248, 2002.

NAOUM, P.C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, 23: 15-23, 2001.

NIELSEN, H.B.; PEDERSEN, B.K. Lymphocyte proliferation in response to exercise. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 75: 375-379, 1997.

NIEMAN, D.C. Exercise Immunology: practical applications. **Int J Sports Med.**, 18:S91-S100, 1997.

NIEMAN, D. C. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 26:128-139, 1994.

OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ASP, S.; SCHJERLING, P.; PEDERSEN, B.K. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol.**, 515:287-291, 1999.

PEDERSEN, B.K.; Exercise and cytokines. **Immunol Cell Biol.**, 78: 532-535, 2000.

PEDERSEN, B.K.; OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; BRUUNSGAARD, H. The cytokine response to strenuous exercise. **Can J Physiol Pharmacol.**, 76: 505-11, 1998a.

PEDERSEN, B.K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. Recovery of the immune system after exercise. **Acta**

Physiol Scand., 162: 325-332, 1998b.

ROWBOTTOM, D.G.; GREEN, K.J. Acute exercise effects on the immune system. **Med Sci Sports Exerc.**, 32(Suppl 7): S396-405, 2000.

SHEPHARD, R. J. Exercise, immune function and HIV infection. **J. Sports Med. Phys. Fitness.**, 38 (2): 101-110, 1998.

STARKIE, R.L.; ANGUS, D.J.; ROLLAND, J.; HARGREAVES, M.; FEBBRAIO, M.A. Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. **J Physiol.**, 528: 647-655, 2000.

STARKIE, R.L.; ROLLAND, J.; FEBBRAIO, M.A. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. **Am J Physiol Cell Physiol.**, 281: C1233-C1240, 2001.

VASSILAKOPOULOS, T.; KARATZA, M.; KATSAOUNOU, P.; KOLLINTZA, A.; ZAKYNTHINOS, S.; ROUSSOS, C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **J Appl Physiol.**, 94: 1025-1032, 2003.

WHITE, L.J.; CASTELLANO, V.; McCOY, S.C. Cytokine response to resistance training in people with multiple sclerosis. **J Sports Sciences.**, 24(8): 911-914, 2006.

ZALDIVAR, F.; WANG-RODRIGUES, J.; NEMET, D.; SCHWINDT, C.; GALASSETTI, P.; MILLS, P.J.; WILSON, L.D.; COOPER, D.M. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **J Appl Physiol.**, 100: 1124-1133, 2006.

Anexos

Produção de citocinas (pg/ml)	Smit	LPS	ConA
IL-4	-6,03 ± 0,66	-0,70* ± 1,39	71,64*# ± 15,75
IL-10	-24,75 ± 13,92	391,87* ± 46,50	2152,03*# ± 83,67
IL-6	51,03 ± 12,24	179,36* ± 39,15	330,86*# ± 26,54
TNF- α	11,7 ± 6,14	30* ± 7,92	179,25*# ± 41,79

Figura 2. Tabela referente à produção de citocinas com adição de mitógenos para o grupo que realizou exercício agudo durante 5 minutos em intensidade leve e acrescido de mitógeno, sendo os resultados expressos pela média \pm erro padrão da média ($p \leq 0,05$). **IL-4** \rightarrow n=4, **IL-10** \rightarrow n=3, **IL-6** \rightarrow n=6, **TNF- α** \rightarrow n=5, **Smit** = as amostras que não tinha adição de mitógeno, **LPS** = as amostras acrescidas de lipopolissacarídeo (LPS), **ConA** = as amostras acrescidas de concanavalina A (ConA). *Diferença significativa com as amostras que não foram acrescidas de mitógeno. #Diferença significativa em relação às amostras que continham LPS.

Produção de citocinas (pg/ml)	T18h	T24h	T36h	T48h
IL-4	-5,12 ± 0,34	-6,56 ± 0,45	9,43 ± 14,50	3,46 ± 9,37
IL-10	-78,29 ± 5,23	-85,16 ± 3,97	-10,79 ± 26,73	-22,66 ± 31,51
IL-6	50,2 ± 16,00	50,45 ± 12,35	48,95 ± 11,50	67,95 ± 26,01
TNF- α	1,06 ± 1,63	5,87 ± 1,35	5,5 ± 1,83	6,62 ± 3,21

Figura 1. Tabela referente à curva de produção de citocinas para o grupo não exercitado e sem adição de mitógeno, sendo os resultados expressos pela média \pm erro padrão da média ($p \leq 0,05$). **IL-4** e **IL-10** \rightarrow n=3, **IL-6** e **TNF- α** \rightarrow n=4, **T18h** = as amostras foram coletadas em 18 horas, **T24h** = as amostras foram coletadas em 24 horas, **T36h** = as amostras foram coletadas em 36 horas, **T48h** = as amostras foram coletadas em 48 horas.