

UNIVERSIDADE METODISTA DE PIRACICABA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de
macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários

CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA

Piracicaba
2006

CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA

Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de
macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* - Mestrado em Educação Física -
Faculdade de Ciências da Saúde -
Universidade Metodista de Piracicaba,
como parte final para obtenção do título de
Mestre em Educação Física

Orientadora:
Prof^a Dr^a Cláudia Regina Cavaglieri

Piracicaba
2006

CLÍLTON KRAÜSS DE OLIVEIRA FERREIRA

Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de
macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* - Mestrado em Educação Física -
Faculdade de Ciências da Saúde -
Universidade Metodista de Piracicaba,
como parte final para obtenção do título de
Mestre em Educação Física

Aluno: Clílton Kraüss de Oliveira Ferreira
Mestrando em Educação Física, UNIMEP

Orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia Regina Cavaglieri
Doutora em Fisiologia Humana, USP

Banca Examinadora: Prof. Dr. Francisco Navarro
Doutor em Biologia Celular e Tecidual, USP

Banca Examinadora: Prof^a Dr^a Sílvia Cristina Crepaldi Alves
Doutora em Biologia, Unicamp

Suplente: Prof^a Dr^a Rozangela Verlengia
Doutora em Biologia e Patologia Bucodental, Unicamp

Piracicaba

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERREIRA, Clíilton Kraüss de Oliveira

Título: Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - Mestrado em Educação Física - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Metodista de Piracicaba, como parte final para obtenção do título de Mestre em Educação Física

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Pela brilhante orientação, agradeço à Profª Drª Cláudia Regina Cavaglieri.

Pela disponibilidade da presença em minha defesa da dissertação de mestrado, agradeço aos membros da banca examinadora, composta pelos professores:

- Dr. Francisco Navarro
- Drª Sílvia Cristina Crepaldi Alves
- Drª Rozangela Verlengia

Pela ajuda acadêmica nas análises laboratoriais, agradeço aos professores:

- Dr. Rui Curi
- Drª Adrienne Christine Palanch
- Ms. Jonato Prestes
- Ms. Felipe Fedrizzi Donatto
- Rodrigo Dias
- Anelena Frollini

Pela ajuda técnica nas análises laboratoriais, agradeço:

- Darci Aparecida de Latorre Monfrinatto
- Patrícia Carla Paulino Belotto
- Ana Elci da Silva Lima Pessotti
- Luciano Sérgio de Oliveira

Apoio Financeiro: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – Brasil.

RESUMO

FERREIRA, CKO. Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários [Influence of the acute physical exercise on the macrophages and neutrophils innate response in sedentary rats]. 2005. 77 p. Dissertação (Mestrado em Educação Física) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2006.

O exercício físico pode modular positivamente ou negativamente a resposta do sistema imunológico, dependendo da intensidade/duração. O objetivo deste estudo foi determinar a resposta aguda de parâmetros da imunidade inata de ratos sedentários submetidos ao exercício físico em diferentes volumes e intensidades, nas seguintes etapas: *1ª etapa*: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número e a capacidade fagocitária de macrófagos em ratos sedentários; *2ª etapa*: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número, viabilidade, capacidade fagocitária e apoptose de neutrófilos em ratos sedentários. *3ª etapa*: Influência do exercício físico agudo exaustivo em diferentes volumes e nas intensidades leve e moderada sobre o número e capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos peritoneais em ratos sedentários. Utilizamos ratos machos *Wistar*, com 2 meses de idade, e o modelo de exercício utilizado foi a natação. Quanto as análises laboratoriais, foram mensuradas: leucometria; leucograma diferencial; número total e capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos peritoneais; viabilidade, fragmentação do DNA e potencial transmembrânico da mitocôndria de neutrófilos circulantes; concentração sérica de TNF- α . A análise estatística foi realizada com a aplicação do teste ANOVA, seguido do teste t-Student ($p \leq 0,05$), comparando os grupos exercitados com o grupo controle, com os grupos de volumes e/ou intensidades correspondentes e entre os protocolos, sendo os resultados expressos pela média \pm erro padrão da média. Na 1ª etapa, observamos a manutenção do número e o aumento da capacidade fagocitária nos grupos exercitados na intensidade leve (5L= 6,68% / 15L= 10,96%). Na 2ª etapa, observamos aumento no número (5L= 178,15% / 5M= 13,87% / 15M= 98,50%) e na viabilidade (5L= 6,64% / 15L= 2,32% / 15L= 4,23%) de neutrófilos. No entanto, a capacidade fagocitária diminuiu (5L= 7,58% / 5M= 11,37% / 15M= 24,64%). Por outro lado, esses volumes e intensidades não foram capazes de induzir alterações severas como apoptose. Na 3ª etapa, observamos redução no número total de macrófagos peritoneais na sessão de intensidade leve (EXAGL= 34,47%), porém, houve aumento desta variável após 4 sessões de adaptação (EXADL= 52,80%) . No entanto, a capacidade fagocitária aumentou em todos os grupos exercitados (EXAGL= 18,44% / EXAGM= 9,62% / EXADL= 10,69% / EXADM= 17,64%). Por outro lado, o número total de neutrófilos peritoneais diminuiu nos grupos de intensidade leve (EXAGL= 54,57% / EXADL= 22,21%) e aumentou nos grupos de intensidade moderada (EXAGM= 98,50% / EXADM= 245%). Porém, a capacidade fagocitária diminuiu no grupo que realizou uma sessão de exercício moderado (EXAGM= 24,64%) e aumentou no grupo adaptado para esta sessão (EXADM= 6,87%). Neste contexto, macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários respondem diferentemente ao estresse causado pelo exercício físico, provavelmente pela ação de hormônios do estresse.

Palavras-chave: exercício físico; natação; sistema imunológico; macrófago; neutrófilo.

ABSTRACT

FERREIRA, CKO. Influence of the acute physical exercise on the macrophages and neutrophils innate response in sedentary rats [Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários]. 2006. 77 p. Dissertation (Master's degree in Physical Education) Health Science Faculty, Methodist University of Piracicaba, São Paulo, Brazil.

The physical exercise can modulate positively or negatively the response of the immunological system, depending of the volume/intensity. The objective of this study was to determine the acute response of the innate immunity parameters in sedentary rats submitted to the physical exercise in different volumes and intensities, in the following stages: First stage: Influence of short duration acute physical exercise in the low and moderate intensities on the macrophages number and the phagocytic capacity in sedentary rats; Second stage: Influence of short duration acute physical exercise in the low and moderate intensities on the neutrophils number, viability, phagocytic capacity and apoptosis in sedentary rats. Third stage: Influence of acute exhausting physical exercise exhausting in different volumes and in the low and moderate intensities on the number and phagocytic capacity of the peritoneal macrophages and neutrophils in sedentary rats. It was used male rats Wistar, with 2 months of age, and the model of the exercise was the swimming. About the analyses, were measured: Leukometry; differential leukogram; total number of the peritoneal macrophages and neutrophils; phagocytic capacity of the peritoneal macrophages and neutrophils; viability of the circulating neutrophils; DNA fragmentation of the circulating neutrophils; mitochondrial transmembrane potential of the circulating neutrophils; serum concentration of the TNF- α . The statistical analysis was accomplished with the application of the ANOVA test, following by the t-Student test ($p \leq 0,05$), comparing the exercised groups with the control group, with the corresponding volumes/intensities groups and among the protocols, the results were expressed by the average \pm standard error of the average. In the first stage, we observed the maintenance of the number and the increase of the phagocytic capacity mainly in the groups exercised in the low intensity (5L= 6,68% / 15L= 10,96%). In the second stage, we observed an increase of the neutrophils number (5L= 178,15% / 5M= 13,87% / 15M= 98,50%) and viability (5L= 6,64% / 15L= 2,32% / 15L= 4,23%). However, the phagocytic capacity decreased (5L= 7,58% / 5M= 11,37% / 15M= 24,64%). On the other hand, these volumes and intensities were not capable to induce severe alterations as apoptosis. In the third stage, we observed reduce of the peritoneal macrophages total number in the session of low intensity (EXAGL= 34,47%), however, there was increase of this variable after 4 adaptation sessions (EXADL= 52,80%). However, the phagocytic capacity increased in all of the exercised groups (EXAGL= 18,44% / EXAGM= 9,62% / EXADL= 10,69% / EXADM= 17,64%). On the other hand, the peritoneal neutrophils total number decreased in the groups of low intensity (EXAGL= 54,57% / EXADL= 22,21%) and increased in the groups of moderate intensity (EXAGM= 98,50% / EXADM= 245%). However, the phagocytic capacity decreased in the group that accomplished a session of moderate exercise (EXAGM= 24,64%) and increased in the group adapted for this session (EXADM= 6,87%). In this context, macrophages and neutrophils of the sedentary rats answer differently to the stress caused by the physical exercise, probably for the action of the stress hormones.

Key Words: physical exercise; swimming; immunological system; macrophage; neutrophil.

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS – espécies reativas de oxigênio

CRF – fator de liberação de corticotropina

ACTH – corticotropina

Células NK – células natural killer

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

IL – interleucina

IFN – interferon

PMA – Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

NADPH – subproduto produzido na via das pentoses (NAD= nicotidamina adenina dinucleotídeo)

NADH – subproduto do metabolismo aeróbio (NAD= nicotidamina adenina dinucleotídeo)

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

PBMC – células mononucleadas do sangue periférico

MIP – proteína inflamatória de macrófago

s TNF- α r – receptor de fator de necrose tumoral – α solúvel

IFN- γ - interferon gama

LPS – lipopolissacarídeo

MAC-1 ou LFA-1 – moléculas de integrina

ICAM-1 – moléculas presentes nas células do endotélio vascular estimulado pelo TNF- α

CD11b e CD16 – antígenos de superfícies

VO_{2máx.} – consumo máximo de oxigênio frente ao esforço físico máximo

PBS – solução tampão

DNA – ácido desoxirribonucléico

PRL – prolactina

FSC – detector forward scatter que é sensível à dispersão frontal da luz

SSC - detector side scatter que é sensível à dispersão lateral da luz

FL1 e FL2 - detectores fluorescentes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com o Percentual de Neutrófilos (B), Linfócitos (C) e Monócitos (D) Circulantes (1ª etapa).....	40
Figura 2 Número Total (A) e Capacidade Fagocitária (B) de Macrófagos Peritoneais (1ª etapa).....	41
Figura 3 Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com o Percentual de Neutrófilos (B), Linfócitos (C) e Monócitos (D) Circulantes (2ª etapa).....	43
Figura 4 Número Total(A) e Capacidade Fagocitária (B) de Neutrófilos Peritoneais(2ª etapa).....	45
Figura 5 Viabilidade (A), Fragmentação de DNA (B) e Potencial Transmembrânico da Mitocôndria (C) de Neutrófilos Circulantes(2ª etapa).....	46
Figura 6 Concentração Sérica de TNF-á (2ª etapa).....	47
Figura 7 Leucometria e Leucograma Diferencial com o Percentual de Neutrófilos, Linfócitos e Monócitos Circulantes - A (ratos normais) (3ª etapa).....	49
Figura 8 Leucometria e Leucograma Diferencial com o Percentual de Neutrófilos, Linfócitos e Monócitos Circulantes – B (ratos tratados com glicogênio de ostra) (3ª etapa).....	50
Figura 9 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais A (ratos normais) e B (ratos tratados com glicogênio de ostra) (3ª etapa).....	52
Figura 10 Estrutura Geral dos Resultados nas 3 Etapas.....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Leucócitos.....	14
1.2 Efeitos do Exercício Físico sobre o Sistema Imunológico.....	15
1.3 Resposta Inata de Macrófagos e Neutrófilos Frente ao Exercício Físico.....	23
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivo Específico.....	28
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Estrutura Experimental Geral para as 3 Etapas.....	31
4.1.1 Animais.....	31
4.1.2 Exercício Físico.....	31
4.1.3 Grupos Experimentais.....	32
4.1.4 Leucometria e Leucograma Diferencial.....	33
4.1.5 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais.....	34
4.1.6 Análise Estatística.....	35
4.2 Estrutura Experimental Específica para a 2ª Etapa.....	36
4.2.1 Obtenção de Neutrófilos do Sangue Periférico.....	36
4.2.2 Viabilidade de Neutrófilos Circulantes.....	36
4.2.2.1 Determinação da Integridade de Mem- brana Celular.....	36
4.2.3 Apoptose de Neutrófilos Circulantes.....	37
4.2.3.1 Determinação da Fragmentação de DNA.....	37
4.2.3.2 Determinação do Potencial Transmem- brânico Mitocondrial.....	37
4.2.4 Dosagem Sérica de TNF- α	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 1ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número e a capacidade fagocitária de macrófagos em ratos sedentários.....	39
5.1.1 Leucometria e Leucograma Diferencial.....	39
5.1.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos Peritoneais.....	41
5.2 2ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número, viabilidade, capacidade fagocitária e apoptose de neutrófilos em ratos sedentário.....	42
5.2.1 Leucometria e Leucograma Diferencial.....	42
5.2.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Neutrófilos Peritoneais.....	44
5.2.3 Viabilidade e Apoptose de Neutrófilos Circulantes.....	45
5.2.4 Concentração Sérica de TNF- α	47
5.3 3ª etapa: Influência do exercício físico agudo exaustivo em diferentes volumes e nas intensidades leve e moderada sobre o número e capacidade	

fagocitária de macrófagos e neutrófilos peritoneais em ratos sedentários.....	48
5.3.1 Leucometria e Leucograma Diferencial.....	48
5.3.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais.....	51
5.4 Estrutura Geral dos Resultados nas 3 Etapas.....	53
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
8 REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS	
Artigo 1 Submetido ao Journal of Exercise Physiology (JEP).....	1-18
Artigo 2 Submetido à Revista Brasileira de Fisioterapia.....	1-22

1 INTRODUÇÃO

O treinamento sistemático e de longo prazo provoca alterações significativas nas estruturas e nas funções orgânicas do praticante. O programa de preparação física é um fator importante nas respostas da performance humana. Sabe-se que os resultados conseguidos na prática esportiva pelos seres humanos são conseqüências dos fatores hereditários, ambientais e dos programas específicos de treinamento.

O conhecimento da ciência do esporte, tanto no contexto das teorias da preparação física quanto dos fatores psicológicos e nutricionais, é buscar explicações de como o atleta pode estar protegido, em seu estado de saúde, para conseguir com menor gasto energético, realizar suas provas esportivas, pois a intenção da comunidade científica é que o praticante consiga realizar seus treinamentos e a competição, com o mínimo de esforço e perda de tempo, alcançando melhores resultados técnicos, tanto qualitativos quanto quantitativos.

Neste contexto, o respaldo científico na prática esportiva é de grande importância aos seres humanos, já que os resultados apontam para uma rotina mais saudável aos praticantes de atividade física que se orientam para melhoria da qualidade de vida (PEDERSEN, SALTIN, 2006). A atividade física afeta a competência do sistema imunitário, porém estes efeitos variam de acordo com o tempo e a intensidade do exercício físico, sendo que os mecanismos envolvidos não foram completamente elucidados (PEDERSEN, SALTIN, 2006). Estes efeitos podem ser mediados por meio das ações dos hormônios do estresse, interação neuro-endócrina, citocinas, fatores hematológicos, nutricionais e redução da concentração plasmática de glutamina (PEDERSEN, SALTIN, 2006). Alguns autores têm relatado que exercícios de intensidade moderada parecem exercer um efeito benéfico sobre

as células do sistema imunitário, enquanto que outros autores observaram redução da resistência imunitária (GARCIA et al., 1999; CURI, 2000; EKBLÖM et al., 2006; MALM, 2006; PEDERSEN, SALTIN, 2006).

1.1 Leucócitos

No aspecto celular, linfócitos, macrófagos e neutrófilos desempenham um papel central na resposta imunitária e inflamatória. Linfócitos são células circulantes, têm sua origem nos tecidos linfóides primários (timo e medula óssea), podendo migrar para os órgãos linfóides secundários (baço, linfonodos e placas de Peyer). Encontram-se em estado quiescente até serem estimulados a proliferar, por exemplo, durante uma infecção por vírus ou bactérias. Os macrófagos podem diferir em suas características bioquímicas, estruturais e funcionais, dependendo do estado de diferenciação, do microambiente de sua organização no organismo. Em função de sua localização, recebem diferentes denominações: do sistema nervoso central (microglia), fixos no fígado (células de Kupffer), da epiderme (células de Langerhans), do osso (osteoclastos) e os macrófagos livres do espaço alveolar e cavidades serosas (GORDON, 1986). Entretanto, os macrófagos, independentemente de sua localização, compartilham de algumas das propriedades gerais que os tornam semelhantes entre si, como propriedades de espraiamento, de fagocitose e fungicida, bactericida e tumoricida.

Neutrófilos constituem cerca de 60% dos leucócitos circulantes em seres humanos adultos e são as primeiras células de defesa na resposta inflamatória aguda. Microrganismos fagocitados, recobertos ou não com complemento ou anticorpo específico, são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por uma combinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas pelo neutrófilo (STITES, 1991).

Na década de 80, o grupo do Prof. Eric Newsholme determinou que macrófagos e linfócitos utilizam glutamina em altas taxas (CURI et al., 1986) e foi verificada, pela primeira vez, a utilização de glutamina também por neutrófilos (PITHON-CURI et al., 1997). Apesar da inquestionável importância dessas células na resposta imunitária e inflamatória, relativamente pouco se sabia sobre o metabolismo e sua implicação para as diferentes funções desses tipos celulares.

1.2 Efeitos do Exercício Físico sobre o Sistema Imunológico

Tem sido demonstrado que *in vivo* a resposta imunitária é totalmente autônoma. Porém existem interações funcionais com o sistema neuroendócrino e o sistema imunitário que modulam essa resposta frente ao estresse físico, psicológico ou patológico (FLESHNER, 2000; JONSDOTTIR, 2000). Recentes estudos têm evidenciado que atividades físicas são associadas à redução de alguns tipos de câncer, principalmente o de cólon e de mama (McTIERNAN et al., 1998; HARDMAN, 2001). Um dos mecanismos propostos para explicar tal efeito é que a atividade física altera a concentração e a sensibilidade de alguns hormônios, como por exemplo, insulina e estradiol, e também promove alterações na funcionalidade do sistema imunitário. As mulheres menopausadas são encorajadas a fazer reposição hormonal com estradiol e iniciar ou continuar a fazer atividade física. Hoffman-Goetz (1999) observou em camundongos fêmeas que o estradiol induziu a redução da proliferação de linfócitos T e B, sendo que estes efeitos foram mascarados quando foram associados com a atividade física.

Podemos afirmar que a atividade física é caracterizada pelo nosso organismo como estímulo estressante e estes produzem por meio do hipotálamo, uma forte descarga simpática adrenal. As catecolaminas armazenadas são liberadas e produzem seus efeitos cardiovasculares e metabólicos característicos. A mais

importante reação de estresse é a liberação de corticosteróides pelo córtex da glândula supra-renal. Os estímulos estressantes atuam por intermédio de neurônios aferentes ou diretamente sobre o hipotálamo causando uma descarga de Fator de Liberação de Corticotropina (CRF) e corticotropina (ACTH) pela hipófise. Shepard et al. (2000) observaram que a expressão das moléculas endoteliais de adesão de vários subtipos de leucócitos, incluindo as selectinas, integrinas e membros das imunoglobulinas, foi alterada pelo exercício agudo e crônico, provavelmente devido a ação de catecolaminas liberadas no exercício.

Com relação aos corticosteróides, estes também são liberados em situações de estresse e suprimem várias reações inflamatórias e imunitárias. Em camundongos, ratos e coelhos, os glicocorticóides provocam extensa destruição linfóide. Por outro lado, os linfócitos de cobaias, macacos e seres humanos mostram-se altamente resistentes a lise induzida por esteróides. As atividades antiinflamatórias e imunossupressoras dos corticosteróides podem ser relacionadas com as ações sobre o trânsito celular e funcionalidade dos leucócitos (STITES, 1991). É sabido que o exercício físico pode influenciar as concentrações de neuropeptídeos, como substância P, neuropeptídeo Y e peptídeo intestinal vasoativo, no sistema nervoso, bem como no sangue periférico (JONSDOTTIR, 2000). Estas alterações na resposta da função imunitária frente ao exercício têm sido sugeridas como uma nova interação bidirecional entre sistema nervoso e imunitário.

Alguns estudos observaram que exercícios físicos intensos e de curta duração elevam o número total de leucócitos no sangue numa relação diretamente proporcional à intensidade do exercício, sendo que esta elevação ocorre principalmente no que tange à série granulocítica e em especial aos

poliformonucleares (BENONI et al., 1995; HOST et al., 1995; GHORAYEB, BARROS, 1999). O número de monócitos e de linfócitos igualmente sobem, mas em menor escala (NIEMAN, 1994; HOST et al., 1995), sendo que as células “Natural Killer” (NK) são as que mais aumentam no âmbito da subpopulação dos linfócitos. A explicação mais cogitada para esta linfocitose passageira se deve principalmente à liberação de catecolaminas provocada pelo exercício (GHORAYEB, BARROS, 1999). Após cinco minutos do término do exercício, a contagem de linfócitos começa a diminuir e isto se deve, provavelmente, ao efeito persistente de corticoesteróides liberado no desenvolvimento do exercício, diferentemente das catecolaminas que decrescem logo em seguida ao final da atividade física. Em geral, quatro a seis horas após encerrada a atividade física e dentro de 24 horas de repouso, a contagem dos linfócitos se normaliza (HOST et al., 1995). Com relação à função dos demais linfócitos, já foi observado que a capacidade de mitogênese foi abolida nas primeiras horas após o término da atividade física, em virtude da influência das quantidades persistentes de corticoesteróides (HOST et al., 1995; GHORAYEB, BARROS, 1999). Admite-se que exercícios muito intensos são capazes de danificar quantidade de músculos suficiente para desencadear uma resposta inflamatória aguda que envolve reações complexas moduladas pelo sistema imunitário por meio da liberação de citocinas (GHORAYEB, BARROS, 1999).

Citocinas são glicoproteínas, produzidas também por diferentes tipos de células do sistema imunitário, que têm como principal função mediar a comunicação entre as células do sistema imunitário e não imunitário (MOLDOVEANU et al., 2000). As citocinas inflamatórias são moduladas por vários estímulos, incluindo a atividade física, trauma e infecção. O exercício físico afeta a produção sistêmica de citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (RIVIER et al., 1994;

MOLDOVEANU et al., 2000), interleucinas (IL), principalmente interleucina 1 beta (IL-1 β) (MOLDOVEANU et al., 2000), interleucina-6 (IL-6) (MOLDOVEANU et al., 2000; OSTROWSKI et al., 2000), interferons (IFN) e outras citocinas (RIVIER et al., 1994).

Um estudo recente, verificou que em neutrófilos incubados por uma hora, a adrenalina inibiu a produção de ânion superóxido induzidos por PMA (“Phorbol 12-Myristate 13-Acetate”) na presença de glicose, mas esta inibição é parcial na presença de glutamina. O efeito inibitório da adrenalina sobre a geração de ânion superóxido por neutrófilos pode ter ocorrido devido à baixa produção de NADPH nas vias das pentoses. Na presença de adrenalina, os neutrófilos desviariam o fluxo de glicose da via das pentoses para a produção de lactato. Por outro lado, a glutamina aumenta a produção de agentes redutores (NADH e NADPH) no ciclo de Krebs e, neste caso, reduz o efeito inibitório da adrenalina na produção de ânion superóxido (GARCIA et al., 1999). Portanto, durante a atividade física, quando há a liberação de adrenalina, a glutamina pode ter um papel importante na regulação da produção de ânion superóxido, mantendo a capacidade microbicida dos neutrófilos.

Pithon-Curi et al. (2002) identificaram pela primeira vez que a glutamina tem um papel fundamental em proteger neutrófilos da apoptose e manter sua função na resposta inflamatória.

Há evidências de que existe uma associação entre exercícios de resistência aeróbia e o aumento do risco de doenças, principalmente infecções do trato respiratório (NIEMAN, 1994). Vários mecanismos foram propostos na tentativa de explicar esta susceptibilidade desses atletas a infecções respiratórias, porém, recentemente, observou-se uma relação direta entre o exercício e as citocinas.

As citocinas são glicoproteínas solúveis, produzidas também por diferentes tipos de células do sistema imunitário, em resposta aos microorganismos e a outros antígenos, as quais têm como função principal mediar a comunicação entre as células do sistema imunitário, não imunitário e inflamatório (MOLDOVEANU et al., 2000, ABBAS et al., 2003). A maioria das citocinas são secretadas e ligam-se à receptores específicos, localizados na superfície das células alvo (ABBAS et al., 2003). Agem regulando a atividade, o crescimento e/ou a diferenciação dos leucócitos (Fase de Ativação) e na Fase Efetora da imunidade inata e adquirida, ativam diferentes células com intuito de eliminar microorganismos e antígenos (ABBAS et al., 2003).

As citocinas são moléculas mensageiras que transmitem sinais entre várias células do sistema imune e sua produção é induzida em resposta a injúria, exercício, trauma ou infecção. Vários são os trabalhos mostrando que o exercício de resistência aeróbia ou excêntrico aumenta as concentrações plasmáticas de interleucinas, bem como a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) (PEDERSEN, 2000).

Algumas citocinas (interleucina-6, 1ra, 8, proteína inflamatória de macrófago [MIP] 1 α , fator de necrose tumoral α (TNF- α) e receptor de fator de necrose tumoral α solúvel (s TNF- α r) têm sido descritas por aumentarem no plasma, bem como também sua expressão aumentada nas células PBMC durante o exercício de resistência aeróbia (OSTROWSKI et al, 1998 e OSTROWSKI et al., 1999). Em maratonistas o aumento do TNF- α e IL-1 α (2 vezes) é acompanhado por uma elevação significativa da cocentração de IL-6 (100 vezes), bem como da concentração sérica da IL-1ra (PEDERSEN, 2000). A IL-6 é produzida em grande quantidade em relação as outras citocinas em resposta ao exercício no plasma, nas

PBMC e no músculo. O aumento da fagocitose de granulócitos e da concentração plasmática de IL-6 sugere uma resposta pró-antiinflamatória.

O exercício induz a destruição das fibras musculares esqueléticas ativando assim a produção de Interleucina-6, que estimula a produção de receptores antagonistas de IL-1 nas células do sistema imune presentes na circulação sanguínea. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória chave na fase aguda da resposta inflamatória. É produzida por diferentes tipos de células e são originalmente estimuladas pelos monócitos. Recentemente foi observada uma relação direta entre sua concentração plasmática e a intensidade de corrida (XING, et al.,1998; OSTROWSKI et al., 2000), o que poderíamos hipoteticamente relacionar com aumento proporcional da lesão muscular (NIEMAN, PEDERSEN,1999).

PEDERSEN (1998) demonstrou que atletas que realizam treinamento de alta intensidade têm uma maior depressão do sistema imunitário após os exercícios intensos, já que eles contraem infecções nas próximas duas semanas, o que se deve às alterações imunes ocorridas entre três e setenta e duas horas após exercícios, denominadas “janela imunológica”. Há evidências de que exista uma associação entre exercícios de resistência aeróbia e o aumento do risco de doenças, principalmente infecções do trato respiratório (NIEMAN, 1994). Faz sentido que o risco de infecção respiratória esteja aumentado em atletas que se submetam a ciclos repetidos de exercício exaustivo e estes tenham sido recentemente expostos a patógenos, e tenham passado por outros fatores que alteram o sistema imune, como, por exemplo, pouco repouso entre as atividades realizadas, estresse, má nutrição ou perda de peso corporal (NIEMAN, 1994).

Em uma situação de exercício extremo (corrida), o pico de concentração sérica de IL-6 foi encontrado imediatamente após o exercício, enquanto a IL-1

apresentou picos de uma a duas horas após o exercício; uma vez que tais citocinas estão envolvidas com os processos inflamatórios, deduziu-se que exercícios extenuantes levam a um aumento na ocorrência de sepsis e infecções respiratórias (NIEMAN, PEDERSEN, 1999). Também foi observado um aumento na produção de Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) após esforço físico intenso (INGLOT et al., 1999).

Normalmente, o TNF- α é sintetizado primeiro, seguido da IL-1, IL-6, IL-1ra, receptores do TNF e IL-10 (SPRENGER et al., 1992; DRENTH et al., 1995; TSIGOS et al., 1997; OSTROWSKI et al., 1998b). INGLOT et al. (1999) sugeriram que a concentração plasmática de citocinas pode ser inicialmente marcadora de imuno profilaxia.

A partir do estudo de OSTROWISK et al. (1998c) mostrando que biópsias de músculo esquelético coletadas depois de uma corrida de maratona, passaram a expressar RNAm da IL-6, enquanto que as amostras coletadas antes da corrida não expressaram RNAm da IL-6, sugeriu-se o músculo esquelético como produtor de IL-6. Outras pesquisas foram desenvolvidas mostrando essa correlação, entre elas a de JONSDOTTIR et al., (2000) que avaliaram a síntese da IL-6 no músculo esquelético da pata de ratos submetidos a contrações excêntricas ou concêntricas a partir de estímulos elétricos. Esses pesquisadores encontraram aumento nas concentrações do RNAm da IL-6, em resposta tanto ao exercício excêntrico quanto concêntrico, considerando que o músculo da pata em repouso não teve elevação na expressão RNAm da IL-6. Este estudo indica que a produção da IL-6 está relacionada com a contração do músculo e não devido a um efeito sistêmico. Nessa linha de investigação, MOLDOVEANU et al. (2000) avaliaram as alterações induzidas pelo exercício nas concentrações das citocinas do plasma e a sua

expressão gênica em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). Os testes foram realizados em humanos submetidos a exercício como ciclismo e caminhada sob inclinação. Foi observado um aumento na produção das citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α no plasma após o exercício. Já as expressões gênicas dessas citocinas nas células mononucleadas não foram alteradas com o exercício. Mostrando que as células PBMC não estariam envolvidas na produção dessas citocinas.

Embora a IL-6 promova a diferenciação das células B e T (MURAGUCHI et al., 1988) e seja induzida com citocinas que estão envolvidas na cascata inflamatória, esta não medeia sintomas pró-inflamatórios quando infundida em humanos (TILG et al., 1997). Embora classificada como citocina pró-inflamatória, a ação da IL-6 tem sido evidenciada como predominantemente antiinflamatória (BARTON, 1997), como por exemplo, IL-6 não regula mediadores inflamatórios tais como prostaglandinas, óxido nítrico ou metaloproteinases de matriz, não induz a síntese de moléculas de adesão envolvidas na resposta inflamatória, tais como moléculas de adesão intracelular 1, inibe a síntese de IL-1 e TNF- α *in vivo* e *in vitro* induzida por lipopolissacarídeos (LPS) (BARTON, 1997 e XING et al., 1998) e induz moderada produção de proteína de fase aguda pelo fígado (XING et al., 1998).

Esses dados sugerem que citocinas inibitórias (IL-1ra e rTNF- α solúvel) e anti-inflamatórias (IL-6, IL10 e IL-4) produzidas durante o exercício restringem a magnitude e duração da resposta inflamatória. Assim, apresentando-se como uma resposta ao dano muscular.

Outras funções da citocina IL-6 liberada durante o exercício incluem: reparo do tecido danificado, estimulação da hipertrofia do músculo e medula e regulação

do metabolismo, diretamente ou por meio de mediadores hormonais (FEBBARIO, PEDERSEN, 2002; SHEPARD, 2002).

Recentemente foi observada a relação entre interleucina-6 e metabolismo. A interleucina-6 produzida e liberada pelo músculo esquelético, mesmo na ausência da lesão muscular, parece ter um importante papel na sinalização entre outros órgãos e o próprio músculo para manter o aporte de substratos energéticos durante o exercício físico (STEENBERG, 2003). PEDERSEN et al. (2003) observaram que a produção de IL-6 é modulada pelo conteúdo de glicogênio no músculo, portanto IL-6 poderia ser caracterizada como um sensor energético. Recente estudo de FROST et al. (2004) observaram que o aumento na síntese de IL-6 no músculo esquelético era induzido pela adrenalina *in vivo* e em miócitos *in vitro*, utilizando predominantemente os receptores β -2 adrenérgicos. IL-6 ainda exerce efeito sobre o tecido adiposo, elevando a taxa de lipólise e oxidação dos lipídios (KELLER et al. 2003; PEDERSEN et al. 2003). Tais fatos podem esclarecer porque altas concentrações dessa citocina são encontradas durante a prática de atividade física (STEENBERG, 2003). Mais estudos são necessários para esclarecer os possíveis efeitos benéficos do exercício físico e sua relação com a secreção de citocinas.

A queda na concentração plasmática de glutamina também tem sido implicada como possível fator causal da supressão imunológica (PARRY BILLINGS et al., 1990; KEAST et al., 1995; ROWBOTTOM et al., 1996; NEWSHOLME et al., 1987, 1988, 1989, 1997; CURI, 2000).

1.3 Resposta Inata de Macrófagos e Neutrófilos Frente ao Exercício Físico

Tradicionalmente, o exercício tem sido descrito por melhorar a saúde. No entanto, há várias evidências acumuladas mostrando que este fato pode ser

realmente verdade, porém, o volume e a intensidade são fatores críticos. Enquanto o exercício moderado regular é muito comumente associado com a redução da susceptibilidade a infecções, o exercício exaustivo tem sido associado com sintomas de imunossupressão transitória, com aumento da susceptibilidade a infecções (NASH, 1986; ASGEIRSSON, BELLANTI, 1987; FITZGERALD, 1988; CAREN, 1991; SIMON, 1991; SHARP, PARRY-BILLINGS, 1992; FRIMAN, ILBÄCK, 1998; WOODS et al., 1999; KÖNIG et al., 2000).

A imunidade inata é constituída de macrófagos, neutrófilos, células NK, complemento e defensinas. Juntos eles constituem a primeira linha de defesa do organismo. Macrófagos e neutrófilos são as principais células desse sistema. Pelo acoplamento, processamento e apresentação de antígenos, os macrófagos formam um elo crítico com a imunidade adquirida, que consiste de vários tipos de linfócitos e seus produtos. No mesmo aspecto, os neutrófilos também colaboram com a imunidade adquirida via citocinas (ORTEGA, 2003).

Neutrófilos são os leucócitos mais freqüentes no sangue e as primeiras células a migrarem para o tecido inflamado. Os neutrófilos possuem vida bastante curta, com alto poder de fagocitose e de produção de radicais livres e enzimas com ação microbicida. Estas células muitas vezes morrem junto com os patógenos formando o pus. Durante os processos inflamatórios com determinadas bactérias e outros agentes infecciosos, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no foco inflamatório, seguidos pelos macrófagos (PITHON-CURI et al., 1997).

A migração de monócitos e neutrófilos dos vasos para o local da infecção inicia-se com a interação de moléculas chamadas selectinas, que estão presentes na superfície de células endoteliais, e reconhecem resíduos de açúcares (lectinas) presentes nos leucócitos (adesinas). Essa interação é fraca e permite o rolamento

do leucócito ao longo do vaso (ABBAS et al., 2003). A IL-8 associada à proteoglicanas expressas no endotélio vascular ativa as moléculas de integrina (MAC-1 ou LFA-1) da superfície dos leucócitos, que alteram sua conformação, ganhando mais afinidade pelo ICAM-1 (moléculas presentes nas células do endotélio vascular estimulado pelo TNF- α). A interação do ICAM-1 com as integrinas é forte, cessando o rolamento dos leucócitos e fazendo com que estas células atravessem por diapedese a parede do vaso e migrem para o local da infecção. A seguir, as células caminham pelos tecidos por meio de um gradiente de quimiocinas que fagocitam o patógeno (PEAKMAN, VERGANI, 1999; PLAYFAIR, LYDYARD, 1999; STITES et al., 2000; ABBAS et al., 2003; ROITT et al., 2003).

Uma vez fagocitados, os patógenos são mortos pela liberação de grânulos intracelular contendo enzimas proteolíticas ou pela “explosão respiratória” de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por isso, os efeitos do exercício sobre cada um desses métodos de destruição de patógenos (oxidativos e não-oxidativos) têm sido investigado (ROWBOTTOM, GREEN, 2000).

A liberação dos grânulos intracelular, ou desgranulação, está associada com a concentração aumentada de enzimas proteolíticas (ex.: elastase) no plasma e antígenos de superfícies (CD11b e CD16) (ROWBOTTOM, GREEN, 2000). Alguns estudos têm relatado que o exercício agudo produz aumento na concentração de elastase no plasma de praticantes de exercício físico de longa duração (60-150 minutos), com intensidades moderada (50-70% $VO_{2m\acute{a}x.}$), alta (80-100% $VO_{2m\acute{a}x.}$) e até a exaustão (GRAV et al., 1993; SMITH et al., 1996; ROBSON et al., 1999). Gray et al. também relataram uma expressão aumentada de CD11b e CD16 de 6-24 horas após o exercício máximo.

Os efeitos do exercício sobre a “explosão respiratória” estimulada *in vitro* são menos conclusivos. Tem sido relatada uma produção diminuída de espécies reativas de oxigênio (ROS) imediatamente após o exercício de intensidade moderada (50-60% $VO_{2máx.}$) de curta e longa duração, assim como também, na intensidade alta (80-100% $VO_{2máx.}$) até a exaustão (HACK et al., 1992; PYNE et al., 1996; ROBSON et al., 1999). Este fato tem sido denominado como um “período refratário pós-exercício” e sugerido por representar o tempo que os neutrófilos ficam potencialmente menos responsivos a desafios microbiais (PYNE, 1994). Inversamente, outros estudos com 60-90 minutos de exercício de intensidade moderada (50-70% $VO_{2máx.}$) foram relatados por aumentar significativamente a produção de ROS (SMITH et al., 1996; SUZUKI et al., 1996).

Muitos autores têm relatado o papel dos macrófagos e neutrófilos atuando na resposta aos danos estruturais nos músculos esqueléticos induzidos pelo exercício. Mas, se este é o fator principal de alterações pós-exercício na ativação dessas células, podemos perguntar: qual a capacidade dos macrófagos e neutrófilos fagocitarem agentes bacterianos após o exercício?

Embora o estresse tenha sido relatado geralmente como imunossupressivo, atualmente tem-se observado efeito contrário. Neste contexto, o estresse induzido pelo exercício estimula a capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos (ORTEGA et al., 1992; SAXTON et al., 2003). Uma das novas interpretações fisiológicas que está emergindo é que a estimulação geral da fagocitose e outros mecanismos durante o exercício físico extenuante podem contrabalancear a redução da atividade linfóide, prevenindo a entrada e sobrevivência de microrganismos em situações onde as respostas específicas são deprimidas (ORTEGA, 2003). Em alguns casos, este comportamento é também mediado pelos hormônios do estresse,

principalmente catecolaminas e glicocorticóides, ambos imunossupressivos em linfócitos (PEDERSEN, BRUUNSGAARD, 1995; NIEMAN, PEDERSEN, 1999). O papel mediador dos glicocorticóides pode também diferir nas funções não específicas dos macrófagos, como a quimiotaxia e a fagocitose, assim como também, aquelas mais específicas como apresentação de antígenos (MUNK, GUYRE, 1991; WEIGENT, BLALOCK, 1995). Neutrófilos e monócitos podem ser estimulados por catecolaminas ou sinais simpáticos (CARTER et al., 1992; NAGOTAMI et al., 2000; WOODS, 2000). Variações na fagocitose e catecolaminas têm sido propostas como um bom marcador neuro-imuno-endócrino em atletas (ORTEGA et al., 2001). Outros hormônios como os da tireóide, prolactina, GH e endorfinas contribuem em geral nos efeitos do estresse ao exercício sobre a fagocitose (BERNTON et al., 1991; KELLY, 1991).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi determinar a resposta aguda de parâmetros da imunidade inata de ratos sedentários submetidos ao exercício físico em diferentes volumes e intensidades.

2.2 Objetivo Específico

Determinar a resposta aguda de parâmetros da imunidade inata de ratos sedentários submetidos ao exercício físico em diferentes volumes e intensidades nas seguintes etapas:

- 1ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número e a capacidade fagocitária de macrófagos em ratos sedentários.
- 2ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número, viabilidade, capacidade fagocitária e apoptose de neutrófilos em ratos sedentários.
- 3ª etapa: Influência do exercício físico agudo exaustivo e após 5 sessões de exercício com volume progressivo, nas intensidades leve e moderada sobre o número e capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos peritoneais em ratos sedentários.

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Desde a grande explosão cósmica que deu origem ao Universo denominada Big Beng, o movimento se encontra de maneira cíclica. Em nosso plano terreno, esta lei não poderia ser diferente, pois estamos inseridos neste contexto, começando pela biosfera e passando pelos ecossistemas de diferentes espécies, populações de uma espécie, organismos, sistemas orgânicos, órgãos, tecidos, células, moléculas e átomos.

Neste contexto, o ser humano também se interage com o Universo num aspecto cíclico, porém com a particularidade de unir pensamento e movimento. Desta forma, consegue se expressar corporalmente por meio da sua complexidade e motricidade, nesta abordagem sistêmica.

Do ponto de vista fisiológico, essas variáveis se convergem, pois a realização de um movimento voluntário ocorre nas áreas corticais e subcorticais, que enviam sinais ao córtex motor de associação, o qual elabora um “esboço grosseiro” do movimento planejado. O plano de movimento é, então, enviado ao cerebelo e aos gânglios da base. Essas estruturas colaboram para converter o “esboço grosseiro” num programa temporal e espacial preciso. Do cerebelo e dos gânglios da base, o programa preciso é enviado por meio do tálamo até o córtex motor, que envia uma mensagem aos neurônios medulares para a “sintonia medular” e, finalmente, ao músculo esquelético.

Pelo controle neural do movimento citado no parágrafo acima, pode-se dizer que dependendo da maneira como os pensamentos/movimentos são processados, ocorrem no nosso organismo diversos tipos de adaptações crônicas e agudas em diversos sistemas, incluindo o imunológico. Pode-se ter uma visão geral da função do sistema imunológico nos seguintes aspectos: (1) Proteger o organismo dos

invasores causadores de doenças, conhecidos como patógenos; (2) remover células e tecidos mortos ou danificados; (3) reconhecer e remover células anormais.

Sabe-se que o exercício físico promove alterações no sistema imunológico e que essas alterações são moduladas pelo volume e/ou intensidade do exercício. Estudos mostram que atletas de resistência aeróbia são mais susceptíveis a infecções. Por outro lado, autores têm verificado que alguns tipos de exercício promovem melhora do sistema imunológico. Portanto, há tipos de exercícios que são benéficos ou não para a imunidade. A intervenção do pesquisador em Imunologia do Exercício é descobrir um limiar de exercício que seja benéfico para a saúde das pessoas e que este seja utilizado como artefato na profilaxia de doenças crônico-degenerativas pelo combate do sedentarismo e, também, na terapia de dessas doenças. Este objetivo se justifica na prescrição de exercícios para pessoas normais, idosas, atletas, portadoras do vírus HIV, doenças auto-imunes, etc. Então, pode-se dizer que a Imunologia do Exercício não é apenas uma questão de interesse acadêmico, mas é de grande relevância na prescrição de exercícios para toda a população.

A escolha do sujeito experimental, no caso dessa dissertação, ratos (*Rathus novergicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), foi devido aos testes invasivos realizados nos experimentos que, necessariamente, precisou levar esses animais ao óbito.

Com base nesta epistemologia, foi elaborada a dissertação de mestrado denominada “Influência do exercício físico agudo sobre a resposta inata de macrófagos e neutrófilos de ratos sedentários”, que visa determinar a resposta aguda de parâmetros da imunidade inata de ratos sedentários submetidos ao exercício físico em diferentes volumes e intensidades.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estrutura Experimental Geral para as 3 Etapas

4.1.1 Animais

Os procedimentos utilizados estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no “Guide for the care and use of experimental animals” (Canadian Council on Animal Care). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com 2 meses de idade, 200g de peso e foram obtidos do biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum* e foram mantidos em gaiolas coletivas, ambiente com temperatura constante de $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$, ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

4.1.2 Exercício Físico

O modelo de exercício físico escolhido foi a natação, realizada em um tanque com a temperatura de $30^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ no período da tarde, entre 14 e 17 horas, com exceção dos grupos que se exercitaram até a exaustão, que começaram a natação às 2 horas. Os animais foram submetidos apenas uma vez ao exercício físico, sendo que os grupos exercitados na intensidade leve não utilizaram cargas adicionais. Na intensidade moderada, os animais utilizaram uma carga de 5% de seu peso corporal acoplada em seus dorsos, o que corresponde a uma intensidade abaixo do ponto de inflexão da curva do limiar de lactato (GOBATTO et al., 2001; VOLTARELLI et al., 2002). Os animais foram mortos por decapitação imediatamente após o exercício.

4.1.3 Grupos Experimentais

Nas duas primeiras etapas em que houve exercício físico de curta duração, os ratos foram divididos em cinco grupos (n=5 por grupo), sendo eles: (1) Grupo Controle Sedentário (C); (2) Grupo Exercitado 5 Minutos na Intensidade Leve (5L); (3) Grupo Exercitado 15 Minutos na Intensidade Leve (15L); (4) Grupo Exercitado 5 Minutos na Intensidade Moderada (5M); (5) Grupo Exercitado 15 Minutos na Intensidade Moderada (15M).

Na última etapa em que houve exercício físico exaustivo e com volume progressivo, os animais foram divididos em 2 protocolos, sendo eles: ratos normais (estudo com macrófagos) e ratos que receberam tratamento de glicogênio de ostra (estudo com neutrófilos). Em cada protocolo, os ratos foram divididos em cinco grupos (n=5 por grupo), sendo eles: grupo controle sedentário (C), grupos exercitados uma vez nas intensidades leve (EXAGL – EXAUSTÃO AGUDO LEVE) e moderada (EXAGM – EXAUSTÃO AGUDO MODERADO) até a exaustão (intensidade leve = 10 horas (ratos normais) e 3 horas (ratos tratados com glicogênio de ostra) / intensidade moderada = 2 horas e 15 minutos (ratos normais) e 15 minutos (ratos tratados com glicogênio de ostra)) e grupos exercitados submetidos à adaptação de cinco dias nos tempos 5, 15, 30, 45 minutos e exaustão nas intensidades leve (EXADL – EXAUSTÃO ADAPTADO LEVE) e moderada (EXADM – EXAUSTÃO ADAPTADO MODERADO) (intensidade leve = 12 horas (ratos normais) e 5 horas e 30 minutos (ratos tratados com glicogênio de ostra) / intensidade moderada = 2 horas e 45 minutos (ratos normais) e 30 minutos (ratos tratados com glicogênio de ostra)).

4.1.4 Leucometria e Leucograma Diferencial

Leucometria. Os animais foram sacrificados por decapitação (com ou sem exercício, dependendo do grupo trabalhado); o sangue foi colhido em tubo de vidro que continha anticoagulante para hematologia (100 μL para 3,5 mL de sangue); uma alíquota de 10 μL do sangue foi retirada, colocada em um tubo de plástico e acrescentado 190 μL do corante TURKEY; com pipeta o tubo foi homogeneizado; foi preenchida a câmara de Neubauer e feita a contagem total dos leucócitos no microscópio (Cálculo: número encontrado na soma dos 4 quadrantes \div 4 (número de quadrantes) \times 20 (diluição) = número $\times 10^4$); observação: Neste estudo os resultados foram expressos $\times 10^6$.

Leucograma Diferencial. Os animais foram sacrificados por decapitação (com ou sem exercício, dependendo do grupo trabalhado); o sangue foi colhido em tubo de vidro que continha anticoagulante para hematologia (100 μL para 3,5 mL de sangue); o tubo foi homogeneizado e preparado para fazer o esfregaço; foi pego uma lâmina bem limpa e seca (preparada 24h antes), colocado 7,5 μL de sangue sobre a lâmina e com a lâmina extensora a gota de sangue foi pressionada com ângulo de 45° em relação a extremidade da lâmina, no qual foi feito o esfregaço; o arrasto foi procedido em direção a outra ponta da lâmina com velocidade constante; foi seco a temperatura ambiente (2 a 3 minutos) e a coloração foi procedida. Coloração: foi colocado sobre a lâmina de esfregaço 3 mL MAY GRUNWALD e GIEMSA (corantes); após 4 minutos, foi colocado 5 mL de água destilada em cima da lâmina e 2 minutos foram esperados; a lâmina foi lavada com água corrente, deixando-a inclinada para secar em temperatura ambiente); após a secagem a leitura foi procedida em objetiva de imersão; a leitura do leucograma diferencial foi

feita no aparelho LEUCOTRON TP; o resultado foi expresso com ênfase no percentual de monócitos (1ª e 3ª etapas) e neutrófilos (2ª e 3ª etapas).

4.1.5 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais

Foram injetados 10 mL de PBS gelado com o auxílio de uma seringa, no peritônio do animal; foi feita uma massagem na barriga do animal e um corte longitudinal para coleta o líquido injetado; com uma pipeta de Pasteur de plástico o líquido que se encontrava na cavidade peritoneal foi coletado; o líquido foi colocado em um tubo de ensaio de plástico e centrifugado por 1 minuto a 2000rpm ou até o Pelet ser formado; o sobrenadante foi descartado e o Pelet ressuspendido em 10 mL de PBS gelado (diluição 10x) tubo 1; foi pego 1 mL da amostra do tubo 1, colocado em outro tubo e acrescentado 9 mL de PBS gelado, tubo 2 (diluição 10x); 100 µL da amostra do tubo 2 foi pego e colocado em um tubo de plástico; neste tubo de plástico foi acrescentado 100 µL de Triplan Blue e o conteúdo foi homogeneizado com pipeta (diluição 2x); foi preenchida a câmara de Neubauer e feita a contagem do número total de macrófagos peritoneais no microscópio (Cálculo: número encontrado na soma dos 4 quadrantes ÷ 4 (número de quadrantes) x 50 (diluição = 10 x 10 x 2) = número x 10⁴). Observação: neste estudo os resultados foram expressos x 10⁶; após feito a contagem de macrófagos, o cálculo da quantidade de macrófagos ou neutrófilos a serem incubados foi realizado (Cálculo: $c_1 \times v_1 = c_2 \times v_2$, onde: c_1 = Valor de macrófagos que deve conter na solução (2 x 10⁶); c_2 = Valor de macrófagos encontrados na contagem (número ÷ 4 (câmara de Neubauer) x 10 (diluição) x 2 (Tripan); v_1 = Volume (mL) que se deve pegar da solução de células já encontradas; v_2 = Volume constante de 1mL); após feito o cálculo, foram colocadas em eppendorf as seguintes quantidades para incubação (Amostra com macrófagos ou neutrófilos;

zymozan: 50ul; glicose 56 mM: 100ul; albumina defatada: 200ul; PBS q.s.p.: 1 mL); essa solução foi incubada a 37°C por 40 minutos com agitação leve; após a incubação de 40 minutos, foi pego uma alíquota de 100 µl, colocado em tubo de ensaio de plástico e acrescido 100 µl de triplan blue; a câmara de Neubauer foi preenchida e 100 células (macrófagos ou neutrófilos) foram contadas e dentre elas quantas incorporaram o Zymozan; a incorporação só foi válida quando se tinham no mínimo 3 partículas de Zymozan incorporadas; o valor encontrado expressou a percentagem de macrófagos peritoneais que incorporaram no mínimo 3 partículas de zymozan (PITHON-CURI et al., 1997).

Os neutrófilos não são células residentes da cavidade peritoneal. Para que fossem coletados, aproximadamente 4 horas antes do exercício, os animais receberam injeção i.p. de 10 mL de uma solução de glicogênio de ostra tipo II (2%) SIGMA® em PBS. O glicogênio de ostra é um agente irritante local que promove a migração de neutrófilos circulantes para a cavidade peritoneal (PITHON-CURI et al., 1997).

4.1.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com a aplicação do teste ANOVA, seguido do teste t-Student ($p^* \leq 0,05$), comparando sempre os grupos exercitados com o grupo controle e, também, os grupos exercitados com a mesma duração entre si, sendo os resultados expressos pela média \pm erro padrão da média. Na 3ª etapa, em que houve exercício exaustivo e volume progressivo, os protocolos de ratos normais e ratos tratados com glicogênio de ostra também foram comparados.

4.2 Estrutura Experimental Específica para a 2ª Etapa

4.2.1 Obtenção de Neutrófilos do Sangue Periférico

A partir do sedimento de hemácias e granulócitos obtidos com o gradiente de densidade 1077 (histopaque 1077 SIGMA®), foi transferida a camada constituída de hemácias e neutrófilos para um tubo de plástico de 50 mL; o tubo foi completado com 50 mL de solução de hemólise e incubado em gelo por 10 minutos; após a incubação o tubo foi centrifugado a 200g por 10 minutos, a 4° C; o sobrenadante contendo as hemácias foi desprezado e os neutrófilos lavados com PBS; após este procedimento foi verificada por citometria de fluxo a viabilidade dos neutrófilos, pela determinação da integridade de membrana celular e apoptose, pela fragmentação de DNA e pelo potencial transmembrânico mitocondrial (PERES, CURI, 2005).

4.2.2 Viabilidade de Neutrófilos Circulantes

4.2.2.1 Determinação da Integridade de Membrana Celular

Foram ressuspensos 5×10^6 células em 500 µL de tampão salina (PBS); foi adicionado 50 µL da solução de iodeto de propídio (IP) em PBS (2 µg/mL), à suspensão celular; o preparado foi agitado suavemente e incubado à temperatura ambiente, por 5 minutos; foi realizada a leitura no citômetro, imediatamente após a incubação. O iodeto de propídio é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm (FL2). Células com membrana íntegra não permitem a entrada de iodeto de propídio, portanto, baixa fluorescência. Células cuja membrana estivesse rompida permitiram a entrada do iodeto de propídio, que se ligou ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser (PERES, CURI, 2005).

4.2.3 Apoptose de Neutrófilos Circulantes

4.2.3.1 Determinação da Fragmentação de DNA

Foram ressuspensos 1×10^6 células em 200 μL do tampão de lise contendo iodeto de propídio (0,1% citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 2 $\mu\text{g/mL}$ iodeto de propídio); o preparado foi incubado ao abrigo da luz, por até 24h, a 4° C; a leitura foi realizada no citômetro, imediatamente após incubação. O iodeto de propídio é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm (FL2). As células foram rompidas pelo tampão de lise expondo os núcleos. O iodeto de propídio se ligou ao DNA, e as células contendo núcleos íntegros emitiram alta fluorescência. A condensação de cromatina e a fragmentação de DNA puderam ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isso se deve à menor marcação do DNA com o iodeto de propídio devido à condensação da cromatina. Além disso, pedaços menores de DNA captaram menos iodeto de propídio, emitindo menor fluorescência (PERES, CURI, 2005).

4.2.3.2 Determinação do Potencial Transmembrânico Mitocondrial

Foram ressuspensos 1×10^6 células em 1 mL de salina; foi adicionado 1 μL de solução de rodamina 123 (5 mg/mL em etanol); o preparado foi incubado por 15 minutos, a 37°C; as células foram lavadas duas vezes, ressuspensas em 0,5 mL de PBS e incubadas por 30 minutos, a 37°C; a leitura foi realizada no citômetro, imediatamente após a incubação. Rodamina 123 é excitável por laser de argônio (480nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1). Rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente seqüestrado pela mitocôndria. Células com potencial mitocondrial transmembrânico inalterado captaram a rodamina e emitiram alta fluorescência quando atingidas pelo

laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levaram ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitiram menor fluorescência (PERES, CURI, 2005).

4.2.4 Dosagem Sérica de TNF- α

Dosagem feita no soro do sangue dos animais e determinada pelo método ELISA, seguindo as especificações correspondentes ao Kit (BioSource International) (NISHIYAMA et al., 2000; CAVAGLIERI et al., 2003).

5 RESULTADOS

5.1 1ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número e a capacidade fagocitária de macrófagos em ratos sedentários

5.1.1 Leucometria e Leucograma Diferencial

Quando comparamos os grupos exercitados de curta duração nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos aumento significativo na leucometria em todos os grupos exercitados (5L= 110,92% / 15L= 130,58% / 5M= 204,85% / 15M= 181,79%) (Figura 1A). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, constatamos aumento no grupo 5 minutos na intensidade moderada (5M= 44,53%) (Figura 1A). No leucograma diferencial, observamos monocitose nos grupos 5 e 15 minutos na intensidade leve (5L= 50% / 15L= 94,44%) (Figura 1B). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, constatamos redução do percentual de monócitos nos grupos 5 e 15 minutos na intensidade moderada (5M= 22,22% / 15M= 62,85%) (Figura 1B). Nesta etapa, enfatizamos somente o percentual de monócitos, por se tratar de ratos que não foram tratados com glicogênio de ostra.

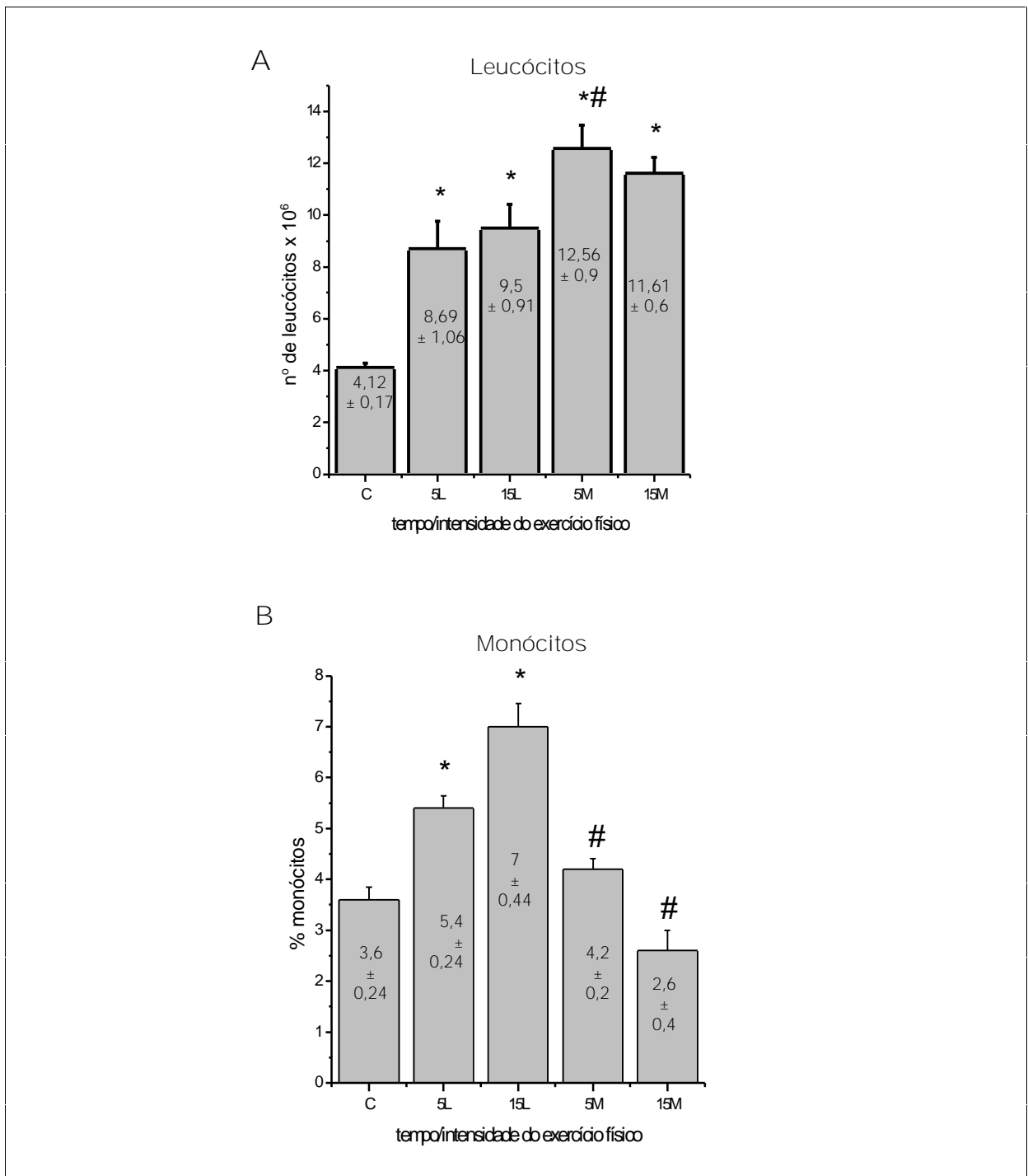


Figura 1 *Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com Ênfase no Percentual de Monócitos (B)*. Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e percentual de células \pm erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.1.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos Peritoneais

Quando comparamos os grupos exercitados de curta duração nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos aumento significativo no número total de macrófagos peritoneais no grupo 15 minutos na intensidade moderada (15M= 48,54%) (Figura 2A). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, constatamos redução no grupo 5 minutos na intensidade moderada (5M= 25,36%) (Figura 2A). Na capacidade fagocitária, observamos aumento significativo nos grupos 5 e 15 minutos na intensidade leve (5L= 6,68% / 15L= 10,96%) quando comparados com o controle (Figura 2B). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, constatamos redução no grupo 5 minutos na intensidade moderada (5M= 6,01%) (Figura 2B).

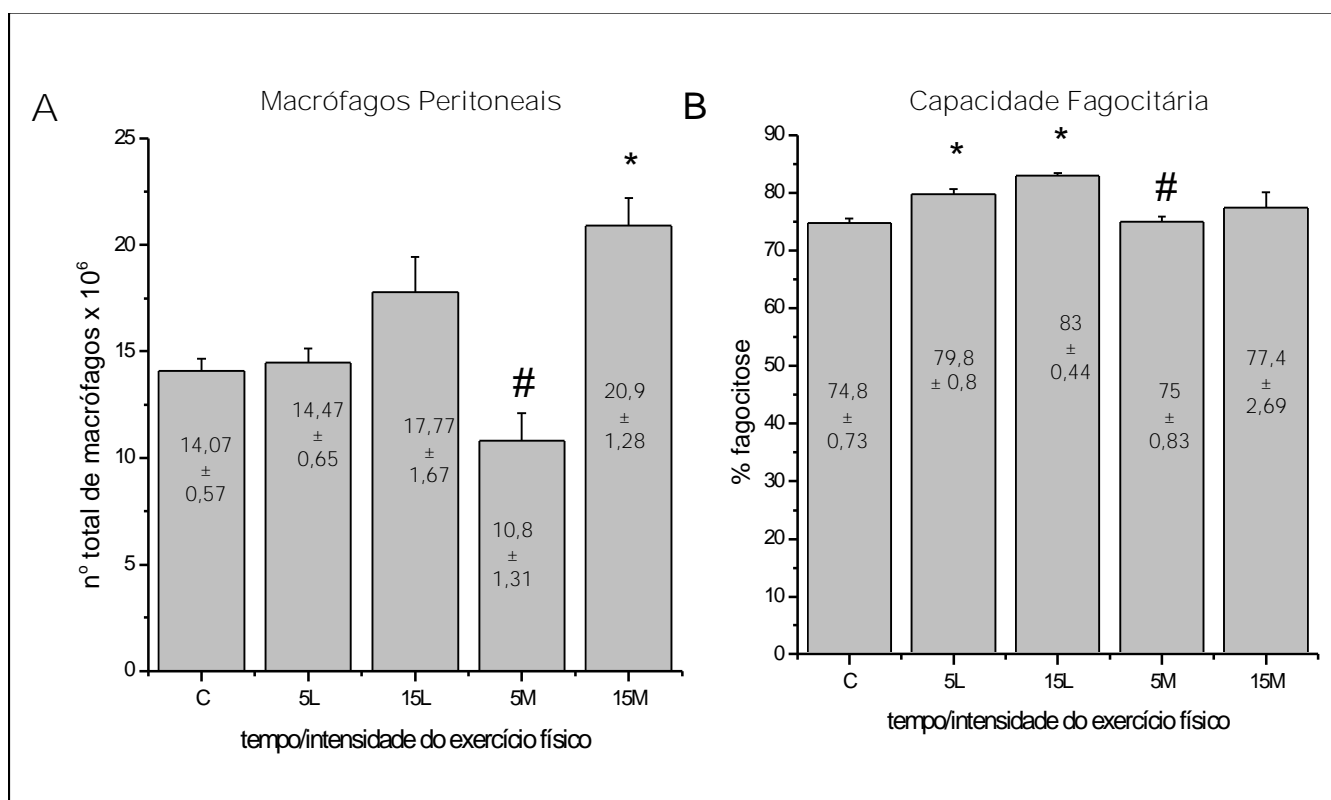


Figura 2 Número Total (A) e Capacidade Fagocitária (B) de Macrófagos Peritoneais. Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e percentual de células \pm erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.2 2ª etapa: Influência do exercício físico agudo de curta duração nas intensidades leve e moderada sobre o número, viabilidade, capacidade fagocitária e apoptose de neutrófilos em ratos sedentários

5.2.1 Leucometria e Leucograma Diferencial

Quando se comparou os grupos exercitados de curta duração nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos aumento significativo na leucometria em todos os grupos exercitados (5L= 61,08% / 15L= 92,78% / 5M= 72,68% / 15M= 100,25%) (Figura 3A). No leucograma diferencial, observamos neutrocitose em todos os grupos exercitados (5L= 24,88% / 15L= 21,19% / 5M= 10,13% / 15M= 12,90%) (Figura 3B). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, observamos redução do percentual de neutrófilos nos grupos que realizaram o exercício físico durante 5 e 15 minutos na intensidade moderada (5M= 11,86% / 15M= 6,84%) (Figura 3B). Nesta etapa, enfatizamos somente o percentual de neutrófilos, por se tratar de ratos que foram tratados com glicogênio de ostra.

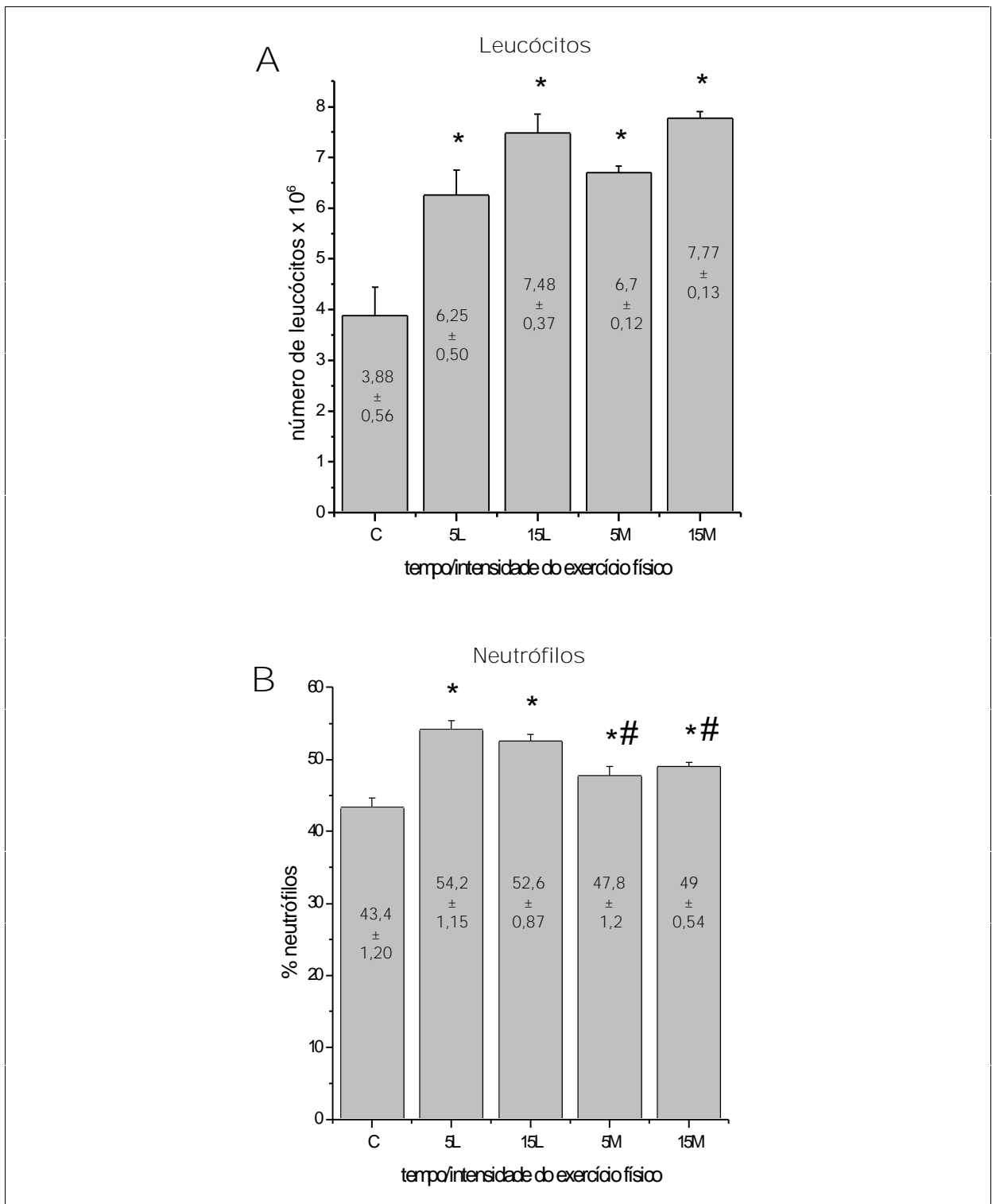


Figura 3 Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com Ênfase no Percentual de Neutrófilos (B) (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra antes do exercício). Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e percentual de células ± erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.2.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Neutrófilos Peritoneais

Quando comparamos os grupos exercitados nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos redução significativa no número total de neutrófilos peritoneais no grupo 15 minutos de intensidade leve (15L= 15,99%) (Figura 4A). Por outro lado, notamos aumento significativo no grupo 5 minutos em ambas intensidades (5L= 178,15% / 5M = 13,87%) e no grupo 15 minutos de intensidade moderada (15M= 98,50%) (Figura 4A). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, observamos redução do grupo 5 minutos de intensidade moderada (5M= 59,06%) e aumento do grupo 15 minutos de intensidade moderada (15M= 136,29%) (Figura 4A). Na capacidade fagocitária de neutrófilos peritoneais, observamos redução no grupo 5 minutos em ambas intensidades (5L= 7,58% / 5M= 11,37%) e no grupo 15 minutos de intensidade moderada (15M= 24,64%) (Figura 4B). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, observamos redução no grupo 15 minutos de intensidade moderada (15M= 25,87%) (Figura 4B).

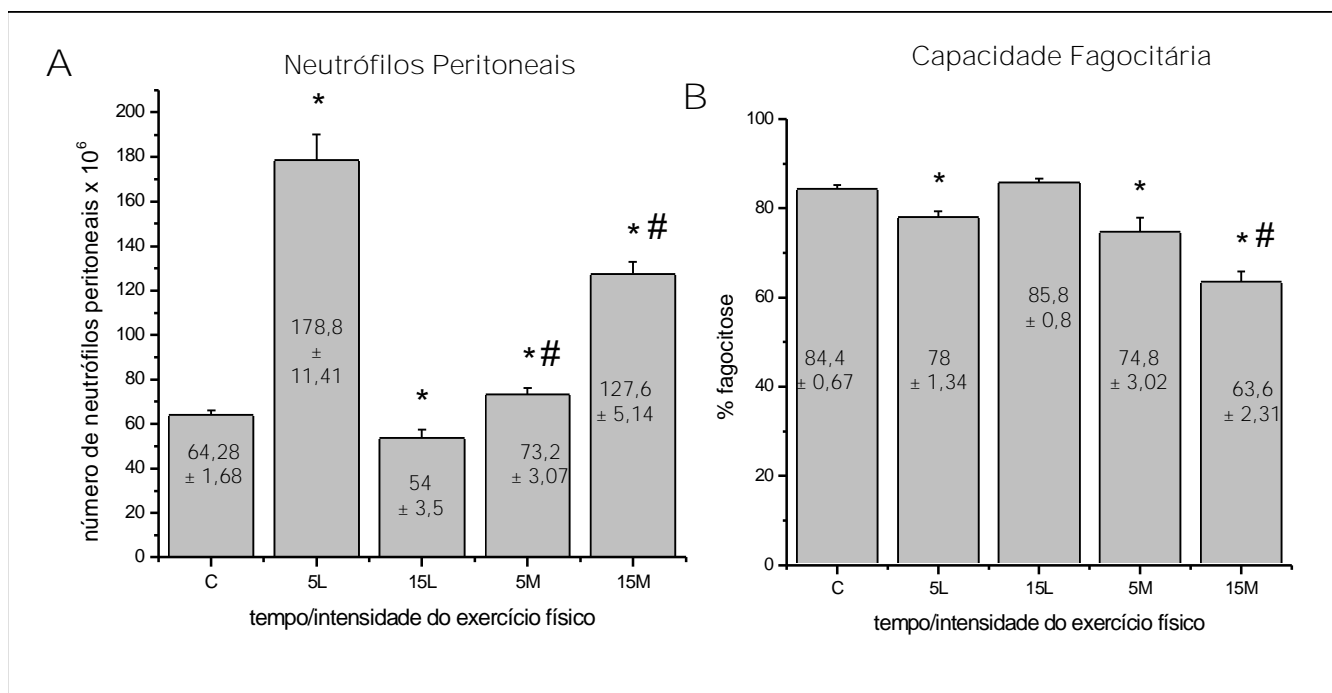


Figura 4 Número Total (A) e Capacidade Fagocitária (B) de Neutrófilos Peritoneais (ratos que receberam tratamento com glicôgeno de ostra antes do exercício). Os resultados foram expressos pela média do número total e percentual de fagocitose de neutrófilos peritoneais \pm erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.2.3 Viabilidade e Apoptose de Neutrófilos Circulantes

Quando comparamos os grupos exercitados nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos um aumento significativo na viabilidade de neutrófilos circulantes nos grupos 5 minutos em ambas intensidades (5L= 6,64% / 5M= 4,23%) e 15 minutos na intensidade leve (15L= 2,32%) (Figura 5A). Na fragmentação de DNA e no potencial transmembrânico mitocondrial, não observamos diferenças estatisticamente significantes nos grupos exercitados (Figuras 5B e 5C).

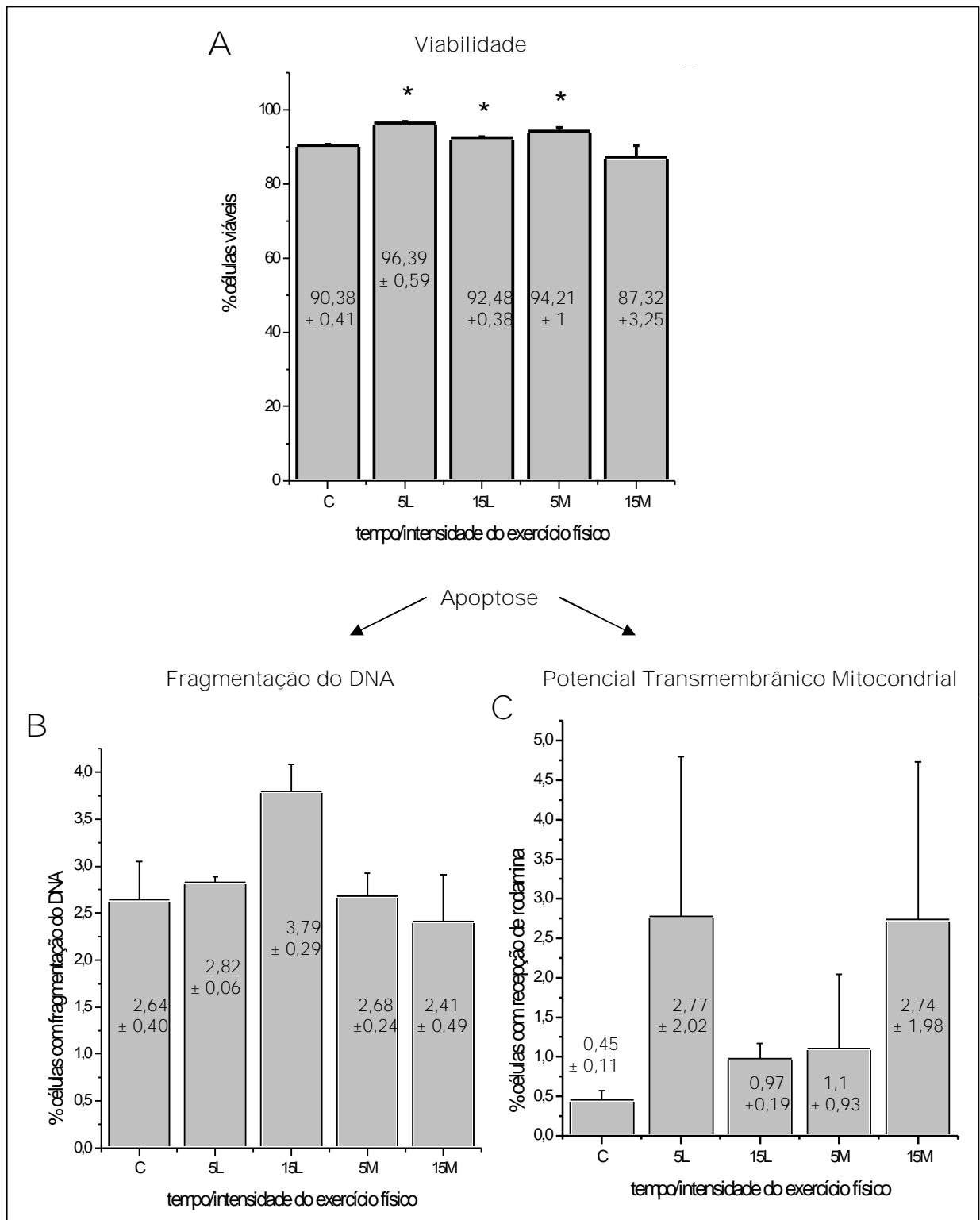


Figura 5 Viabilidade (A), Fragmentação de DNA (B) e Potencial Transmembrânico da Mitocôndria (C) de Neutrófilos Circulantes (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra antes do exercício). Os resultados foram expressos pela média do percentual de células viáveis, percentual de células com fragmentação de DNA e percentual de células com recepção de rodamina \pm erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.2.4 Concentração Sérica de TNF- α

Quando comparamos os grupos exercitados nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, observamos redução significativa na concentração sérica de TNF- α nos grupos 5 e 15 minutos de intensidade moderada (5M= 22,22% / 15M= 20,37%) (Figura 6). Na comparação entre grupos com o mesmo volume, observamos redução no grupo 15 minutos de intensidade moderada (15M= 17,30%) (Figura 6).

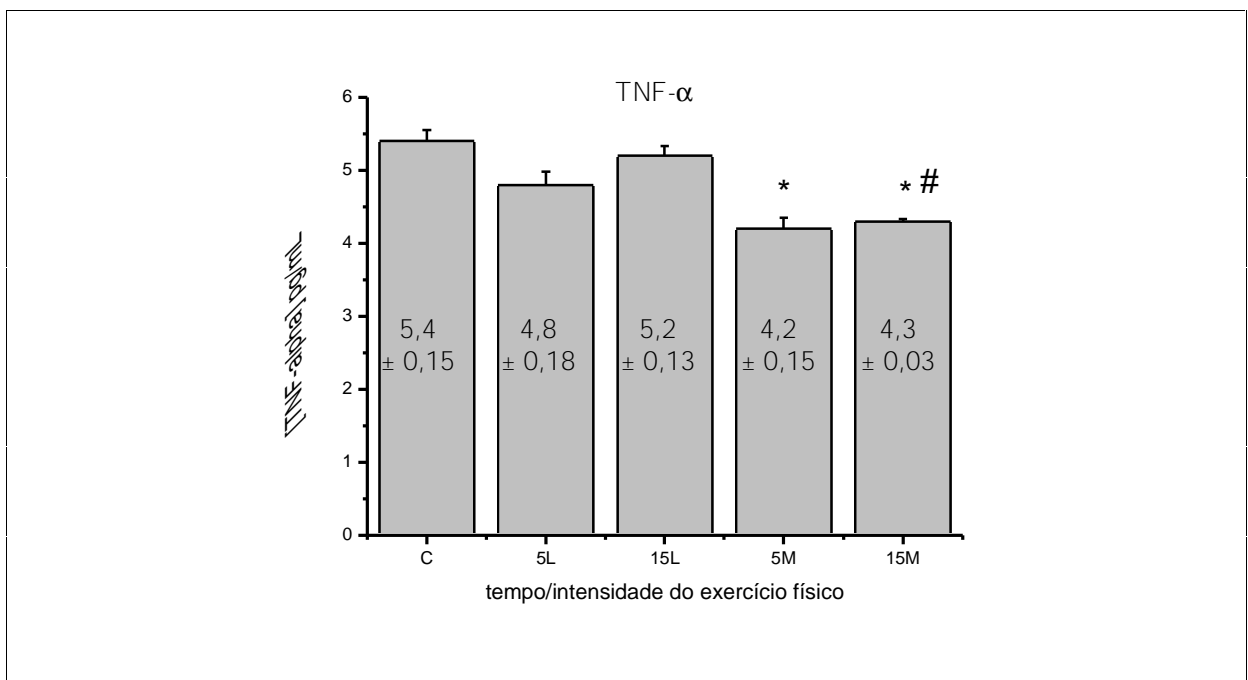


Figura 6 Concentração Sérica de TNF- α (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra antes do exercício). Os resultados foram expressos pela média do percentual de células viáveis, percentual de células com fragmentação de DNA e percentual de células com recepção de rodamina \pm erro padrão da média * $p \leq 0,05$, quando comparado com o grupo controle; # $p \leq 0,05$ quando comparado entre os grupos com o mesmo volume. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderada.

5.3 3ª etapa: Influência do exercício físico agudo exaustivo em diferentes volumes e nas intensidades leve e moderada sobre o número e capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos peritoneais em ratos sedentários

5.3.1 Leucometria e Leucograma Diferencial

Quando comparamos os grupos exercitados apenas uma vez e após adaptação até a exaustão nas intensidades leve e moderada com o grupo controle em ambos protocolos, observamos leucocitose em todos os grupos exercitados [ratos normais (EXAGL= 85,43% / EXAGM= 92,71% / EXADL= 217,47% / EXADM= 216,50%) e ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra (EXAGL= 154,89% / EXAGM= 100,25% / EXADL= 242,26% / EXADM= 247,42%)] (Figuras 7A e 8A). No leucograma diferencial, observamos de maneira geral, monocitose nos animais exercitados no protocolo de ratos normais (EXAGM= 72,22% / EXADL= 66,66% / EXADM= 133,33%) (Figura 7B); neutrocitose nos grupos que realizaram uma sessão de exercício físico em ambas intensidades no protocolo de ratos tratados com glicogênio de ostra (EXAGL= 44,70% / EXAGM= 12,90%) (Figura 8B); neutropenia nos animais que foram adaptados ao exercício físico em ambas intensidades no protocolo de ratos tratados com glicogênio de ostra (EXADL= 39,27% / EXADM= 47,92%) (Figura 8B). No protocolo de ratos normais, enfatizamos somente o percentual de monócitos, por se tratar de ratos que não foram tratados com glicogênio de ostra. Por outro lado, no protocolo de ratos tratados com glicogênio de ostra, enfatizamos somente o percentual de neutrófilos.

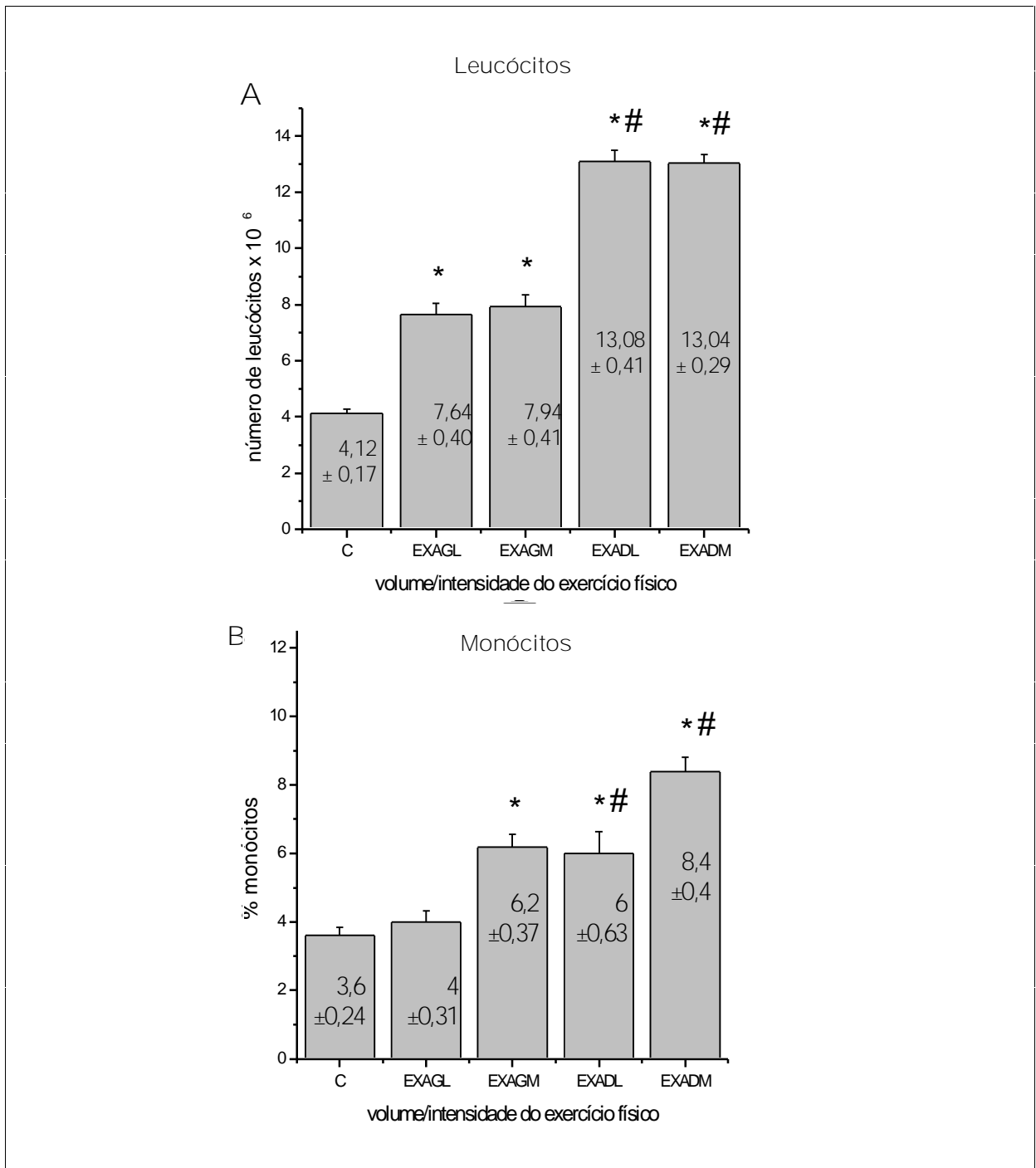


Figura 7 Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com o Ênfase no Percentual de Monócitos (B) (Ratos Normais). Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e o percentual de células \pm o erro padrão da média * $p < 0,05$, quando os grupos exercitados (EXAGL= EXAUSTÃO AGUDO LEVE (grupo exercitado uma vez na intensidade leve até exaustão) e EXADL= EXAUSTÃO ADAPTADO LEVE (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade leve, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) / EXAGM= EXAUSTÃO AGUDO MODERADO (grupo exercitado uma vez na intensidade moderada até exaustão) e EXADM= EXAUSTÃO ADAPTADO MODERADO (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade moderada, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) foram comparados com o grupo controle (C); # $p < 0,05$, quando a comparação foi feita entre grupos com o mesmo volume.

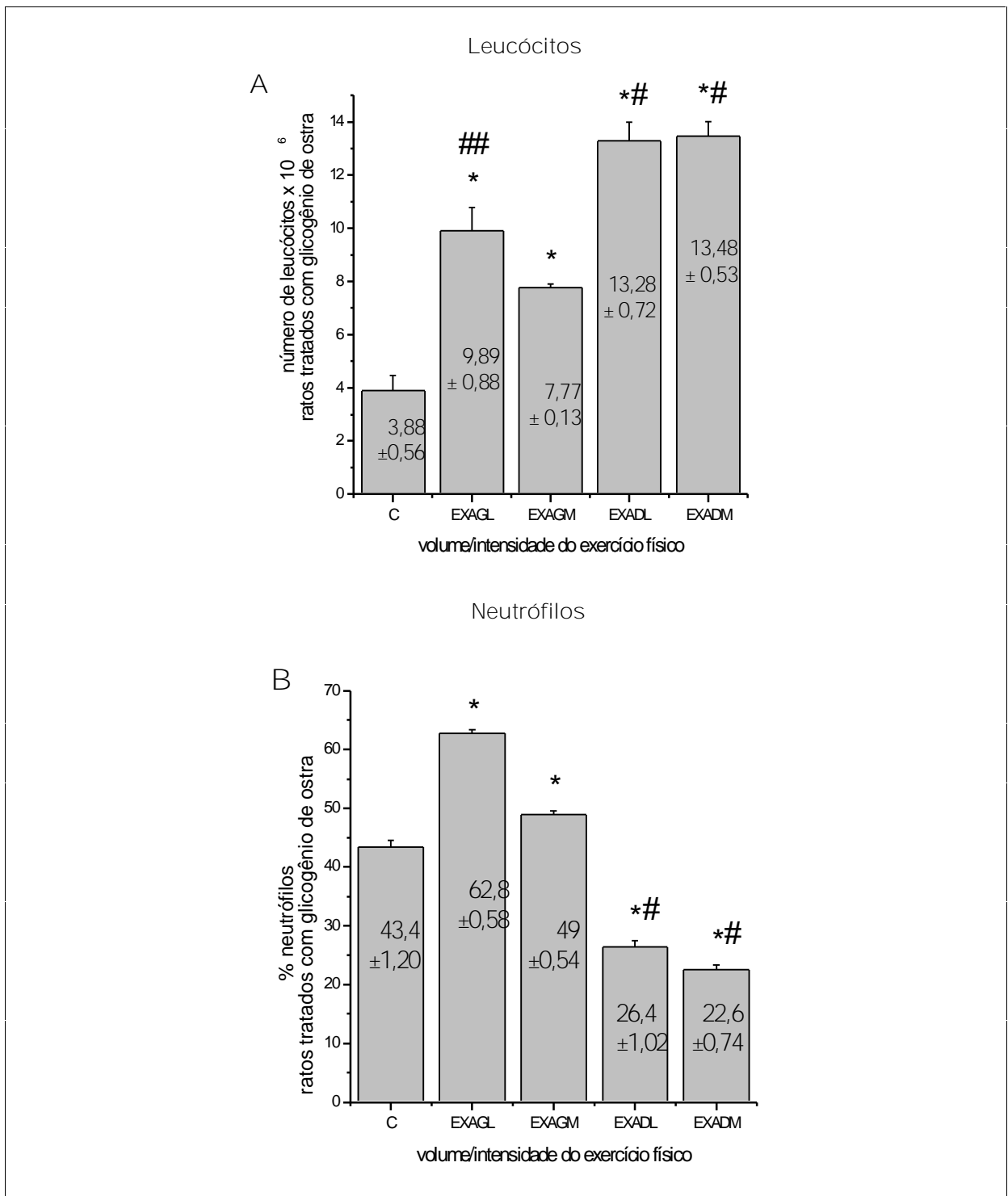


Figura 8 Leucometria (A) e Leucograma Diferencial com Ênfase no Percentual de Neutrófilos (B) (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra). Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e o percentual de células \pm o erro padrão da média * $p < 0,05$, quando os grupos exercitados (EXAGL= EXAUSTÃO AGUDO LEVE (grupo exercitado uma vez na intensidade leve até exaustão) e EXADL= EXAUSTÃO ADAPTADO LEVE (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade leve, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) / EXAGM= EXAUSTÃO AGUDO MODERADO (grupo exercitado uma vez na intensidade moderada até exaustão) e EXADM= EXAUSTÃO ADAPTADO MODERADO (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade moderada, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) foram comparados com o grupo controle (C); # $p < 0,05$, quando a comparação foi feita entre grupos com o mesmo volume final; ## $p < 0,05$, quando a comparação foi feita entre os protocolos de ratos normais e ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra (Figura 7A / 8A).

5.3.2 Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais

Quando comparamos os grupos exercitados apenas uma vez e após adaptação até a exaustão nas intensidades leve e moderada com o grupo controle em ambos protocolos (ratos normais e ratos tratados com glicogênio de ostra), observamos redução no número total de macrófagos peritoneais no grupo que realizou o exercício apenas uma vez (EXAGL= 34,47%) e aumento no grupo adaptado (EXADL= 52,80%) na intensidade leve, no protocolo de ratos normais (Figura 9A1); redução do número total de neutrófilos peritoneais nos grupos de intensidade leve (EXAGL= 54,57% / EXADL= 22,21%) e aumento nos grupos de intensidade moderada (EXAGM= 98,50% / EXADM= 245%), no protocolo de ratos tratados com glicogênio de ostra (Figura 9B1). Na capacidade fagocitária, observamos aumento nos macrófagos em todos os grupos exercitados (EXAGL= 18,44% / EXAGM= 9,62% / EXADL= 10,69% / EXADM= 17,64%), no protocolo de ratos normais (Figura 9A2). Por outro lado, observamos redução por neutrófilos no grupo que realizou uma sessão de exercício na intensidade moderada (EXAGM= 24,64%) e aumento no grupo adaptado para esta sessão moderada (EXADM= 6,87%), no protocolo de ratos tratados com glicogênio de ostra (Figura 9B2).

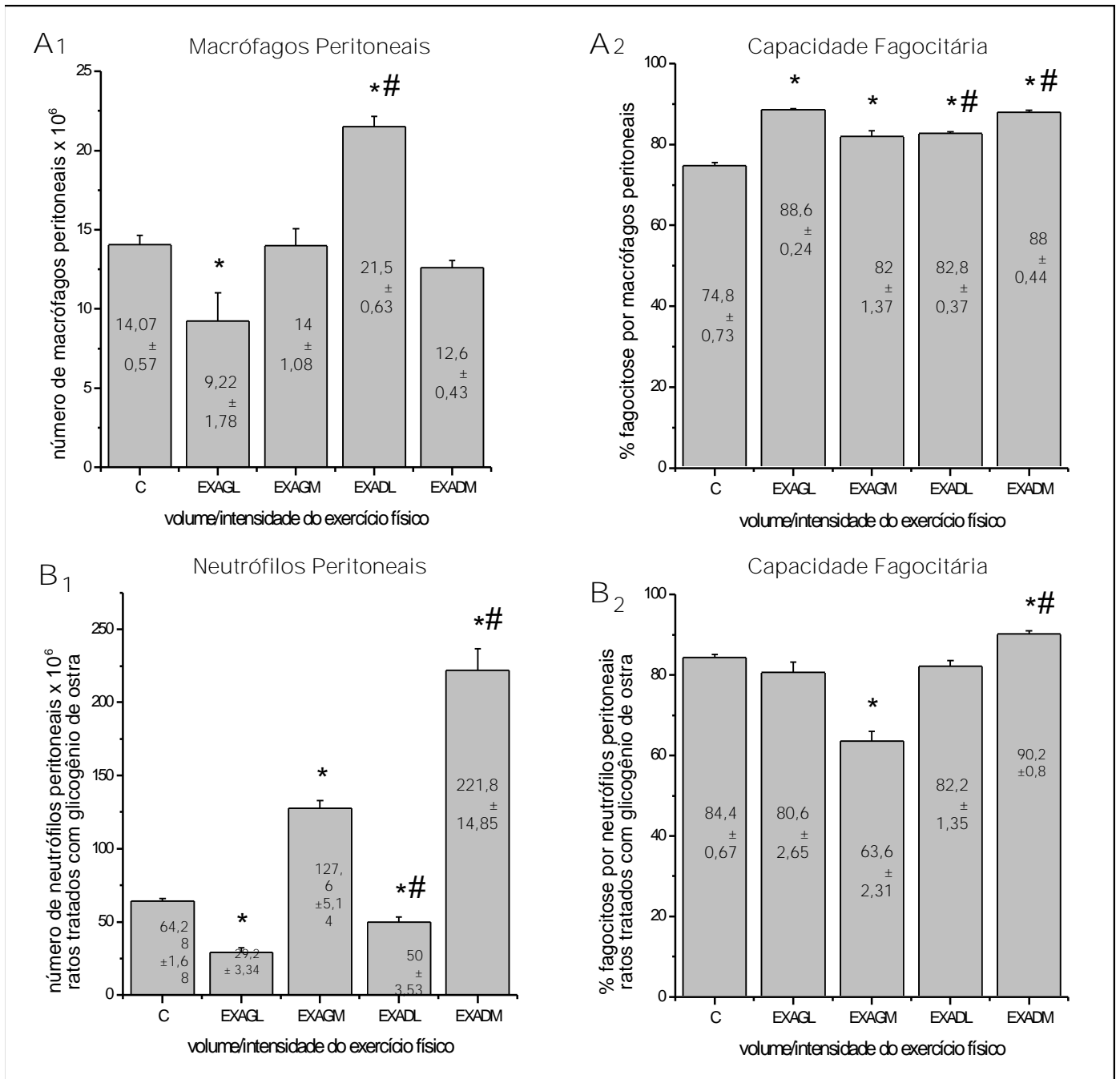


Figura 9 Número Total (A1 e B1) e Capacidade Fagocitária (A2 e B2) de Macrófagos e Neutrófilos Peritoneais A (ratos normais) e B (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra). Os resultados foram expressos pela média do número de leucócitos e o percentual de células ± o erro padrão da média * p 0,05, quando os grupos exercitados (EXAGL= EXAUSTÃO AGUDO LEVE (grupo exercitado uma vez na intensidade leve até exaustão) e EXADL= EXAUSTÃO ADAPTADO LEVE (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade leve, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) / EXAGM= EXAUSTÃO AGUDO MODERADO (grupo exercitado uma vez na intensidade moderada até exaustão) e EXADM= EXAUSTÃO ADAPTADO MODERADO (grupo que realizou cinco dias de adaptação na intensidade moderada, sendo o último dia de exercício físico até exaustão) foram comparados com o grupo controle (C); # p 0,05, quando a comparação foi feita entre grupos com o mesmo volume final; ## p 0,05, quando a comparação foi feita entre os protocolos A (ratos normais) e B (ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra).

5.4 Estrutura Geral dos Resultados nas 3 Etapas

A estrutura geral dos resultados está apresentada na figura abaixo (Figura 10).

ESTRUTURA GERAL DOS RESULTADOS NAS 3 ETAPAS						
ETAPAS	GRUPOS	LEUCOMETRIA (x10 ⁶)	% MONÓCITOS	N° (MACRÓFAGOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (MACRÓFAGOS)	
1ª ETAPA	5L (*)	-	-	-	-	-
	15L (*)	-	-	-	-	-
	5M (*)	-	-	-	-	-
	15M (*)	-	-	-	-	-
2ª ETAPA	LEUCOMETRIA (x10 ⁶)		% NEUTRÓFILOS	N° (NEUTRÓFILOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (NEUTRÓFILOS)	
	5L (GO) (*)	-	-	-	-	-
	15L (GO) (*)	-	-	-	-	-
	5M (GO) (*)	-	-	-	-	-
	15M (GO) (*)	-	-	-	-	-
	% VIABILIDADE		% APOPTOSE (DNA)	% APOPTOSE (MITOCÔNDRIA)	TNF-a (pg/mL)	
	5L (GO) (*)	-	-	-	-	-
	15L (GO) (*)	-	-	-	-	-
	5M (GO) (*)	-	-	-	-	-
	15M (GO) (*)	-	-	-	-	-
LEUCOMETRIA (x10 ⁶)		% MONÓCITOS	N° (MACRÓFAGOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (MACRÓFAGOS)		
EXAGL (*)	-	-	-	-	-	
EXAGM (*)	-	-	-	-	-	
EXADL (*)	-	-	-	-	-	
EXADM (*)	-	-	-	-	-	
3ª ETAPA	% NEUTRÓFILOS		N° (NEUTRÓFILOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (NEUTRÓFILOS)		
	EXAGL (*)	-	-	-	-	
	EXAGM (*)	-	-	-	-	
	EXADL (*)	-	-	-	-	
	EXADM (*)	-	-	-	-	
	LEUCOMETRIA (x10 ⁶)		% MONÓCITOS	N° (MACRÓFAGOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (MACRÓFAGOS)	
	EXAGL (GO) (*)	-	-	-	-	
	EXAGM (GO) (*)	-	-	-	-	
	EXADL (GO) (*)	-	-	-	-	
	EXADM (GO) (*)	-	-	-	-	
% NEUTRÓFILOS		N° (NEUTRÓFILOS x 10 ⁶)	% FAGOCITOSE (NEUTRÓFILOS)			
EXAGL (GO) (*)	-	-	-	-		
EXAGM (GO) (*)	-	-	-	-		
EXADL (GO) (*)	-	-	-	-		
EXADM (GO) (*)	-	-	-	-		

Figura 10 Estrutura Geral dos Resultados nas 3 etapas. Os resultados foram expressos por = aumento; - = inalterado; - = redução; - = inalterado; branco = sem parâmetros de análise. Na análise estatística, foram considerados (*) p<0,05, quando comparados com o controle, sendo os grupos: 5L= grupo exercitado 5 minutos na intensidade leve; 15L= grupo exercitado 15 minutos na intensidade leve; 5M= grupo exercitado 5 minutos na intensidade moderada; 15M= grupo exercitado 15 minutos na intensidade moderada; EXAGL= grupo exercitado uma vez na intensidade leve até a exaustão; EXAGM= grupo exercitado uma vez até a exaustão na intensidade moderada; EXADL= grupo que realizou 5 dias de adaptação na intensidade leve, sendo o último dia de exercício físico até a exaustão; EXADM= grupo que realizou 5 dias de adaptação na intensidade moderada, sendo o último dia de exercício físico até a exaustão. O termo (GO) refere-se aos grupos de ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra.

6 DISCUSSÃO

Um dos efeitos mais conhecidos na literatura sobre o exercício é a leucocitose. O efeito da leucocitose é conhecido desde 1902 (LARRABE, 1902 apud ORTEGA, 2003). Pode ser causado pela combinação dos efeitos dos glicocorticóides e das catecolaminas ou pode ser um fenômeno de desmarginação celular (MACKINNON, TOMASI, 1986; McCARTHY, DALE, 1988; BARRIGA et al., 1993; BRENNER et al., 1998). Em nosso estudo, o exercício promoveu leucocitose em todos os grupos exercitados (Figuras 1A, 3A, 7A e 8A).

Os monócitos são precursores dos macrófagos na circulação e eles podem ser encontrados livres ou marginados (VAN FURTH, SLUITER, 1986). Em resposta ao exercício agudo, o número de monócitos aumenta como resultado da desmarginação mediada por catecolaminas (WOODS et al., 1999; WOODS, 2000). Em nosso estudo, o percentual de monócitos no leucograma diferencial aumentou somente nos grupos exercitados de curta duração e intensidade leve (Figura 1B). Nos grupos que se exercitaram até a exaustão no protocolo de ratos normais, observamos uma tendência a monocitose (Figura 7B).

O exercício extenuante diminui o número de macrófagos peritoneais em ratos e a magnitude deste efeito é positivamente correlacionada com a concentração de corticosterona no soro (ORTEGA et al., 1992). Para entender a relevância fisiológica dos glicocorticóides em mediar os efeitos do exercício sobre o número total de macrófagos peritoneais, a resposta inata foi mensurada com diferentes concentrações de corticosterona em ratos (FORNER et al., 1995). Parece existir uma concentração fisiológica ótima na qual os glicocorticóides podem estimular macrófagos, de acordo com a idéia de que baixas concentrações de glicocorticóides podem realçar a imunidade ao invés de suprimi-la (SHARP, PARRY-BILLINGS,

1992; ORTEGA, 1994; FORNER et al., 1995; BRENNER et al., 1998). A inibição da função de monócitos e macrófagos requer que o fagócito mononuclear seja exposto a uma dose de esteróides que saturem 50% ou maior quantidade de receptores de glicocorticóides disponíveis por pelo menos 24 horas (ORTEGA, 2003). Talvez por uma concentração “ótima” de corticosterona, possamos explicar o aumento do número de macrófagos peritoneais do grupo exercitado por 15 minutos de intensidade moderada (Figura 2A) e no grupo adaptado ao exercício exaustivo na intensidade leve (Figura 9A1).

O exercício físico aumenta a concentração plasmática de muitas substâncias como glicocorticóides, catecolaminas, prolactina, hormônios da tireóide e â-endorfinas (BERNTON et al., 1991; KELLY, 1991). Todas essas substâncias podem melhorar a capacidade fagocitária de macrófagos (ORTEGA, 2003). Em nosso estudo, foi observado aumento na capacidade fagocitária somente nos grupos que realizaram exercício de curta duração e intensidade leve (Figura 2B) e em todos os grupos exercitados exaustivamente (Figura 9A2).

Vários estágios da fagocitose de macrófagos peritoneais têm sido correlacionados com o aumento da concentração plasmática de corticosterona após o exercício extenuante. Por exemplo, a concentração plasmática de corticosterona foi positivamente correlacionada com aderência, quimiotaxia e fagocitose de macrófagos peritoneais em porcos guínea jovens (ORTEGA et al., 1992a). Em animais velhos, no entanto, a concentração plasmática de corticosterona foi correlacionada somente com a fagocitose (ORTEGA et al., 1992b). Em macrófagos de ratos jovens e velhos, a capacidade fagocitária aumentou imediatamente após a natação até a fadiga, ambos com ou sem um período prévio de treinamento. Este

aumento foi acompanhado por maior concentração plasmática de corticosterona (ORTEGA et al., 1993b).

Há evidências da presença de receptores α e β adrenérgicos em macrófagos (ABRASS et al., 1985; MADDEN et al., 1995). Um estudo *in vitro* com administração de noradrenalina, mostrou aumento na capacidade fagocitária de macrófagos em ratos adultos, após incubação com altas concentrações (de 10^{-5} M à 10^{-3} M), porém, os macrófagos de ratos velhos foram estimulados com concentrações de 10^{-3} M (STRAUB et al., 2000). Outros estudos têm mostrado estimulação da fagocitose induzida por noradrenalina e um agonista β -adrenérgico (HARTMAN et al., 1987; ALI et al., 1994; PETERMANN et al., 1996). O comportamento de macrófagos em resposta à noradrenalina é diferente ao encontrado nos linfócitos, pois, altas concentrações dessa substância podem modular positivamente sua funcionalidade. A fagocitose é estimulada com altas concentrações de noradrenalina e envolve receptores α e β adrenérgicos (JAVIERRE et al., 1975; SERIO et al., 1996; GARCÍA et al., 2003).

Estudos mostram que a prolactina (PRL) estimula a capacidade fagocitária de macrófagos. Foi encontrado em nadadores submetidos ao exercício físico até a exaustão, um aumento na PRL plasmática em concentrações capazes de estimular a quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida de fagócitos, confirmando assim, seu papel de hormônio estimulador do sistema imunológico (ORTEGA et al., 1996a; ORTEGA et al., 1996b; ORTEGA et al., 1997). Nesta linha, um estudo *in vivo* em ratos evidenciou que a administração de prolactina estimulou a fagocitose e a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio em macrófagos (CHEN, JOHNSON, 1993). No entanto, ao contrário da corticosterona, o efeito da prolactina sobre a capacidade fagocitária é dose-dependente (ORTEGA et al., 1996a).

Os hormônios da tireóide também podem modular a funcionalidade dos macrófagos durante o exercício (COSTA-ROSA et al., 1991). Sabe-se que macrófagos possuem receptores tireoideanos (LUO et al., 1989). O estresse induzido pelo exercício aumenta a concentração plasmática de hormônios tireoideanos e modulam *in vitro* a quimiotaxia e a fagocitose (FORNER et al., 1996; ORTEGA et al., 1999). A relevância fisiológica deste fato é que este hormônio pode contribuir com o movimento dos macrófagos aos sítios inflamatórios como já relatado por outros hormônios do estresse, como a corticosterona (ORTEGA et al., 1997).

As endorfinas podem estar envolvidas na modulação induzida pelo exercício em macrófagos. Foi demonstrado que a β -endorfina pode modular a função imune (ORTEGA et al., 1997). Células do sistema imunológico não são capazes somente de reagir a este hormônio, como também sintetizá-lo (FABRY et al., 1994). A β -endorfina melhora a quimiotaxia, fagocitose e produção de ânion superóxido em macrófagos e monócitos (VAN EPPS, SALAND, 1984; SHARP et al., 1985; ICHINOSE et al., 1995). A concentração fisiológica encontrada de β -endorfina durante o exercício que aumentou a quimiotaxia e fagocitose foi de (10⁻¹¹ M – 10⁻¹⁰ M) (ORTEGA et al., 1996c; ORTEGA et al., 1997b).

O exercício agudo induz aumento no número de neutrófilos que retorna aos valores normais após 24 horas de repouso (sem exercício) (HOST et al., 1995; SHEPHARD, 1997; NIEMAN et al., 2005). O aumento no número de neutrófilos é verificado durante e imediatamente após vários tipos de exercícios em diversas intensidades e durações, sendo que este fato pode estar relacionado as alterações na concentração plasmática de catecolaminas e à mobilização da medula óssea em resposta à corticosterona elevada (McCARTHY, DALE, 1988; SHEPHARD, 1997). Além disto, a magnitude da neutrofilia é dependente da intensidade e da duração do

exercício (McCARTHY, DALE, 1988; SHEPHARD, 1997). As catecolaminas modulam positiva e negativamente o número de neutrófilos (BRENNER et al., 1998). O aumento das catecolaminas é dependente da intensidade, duração e adaptação ao exercício, o que promove os efeitos agudos do exercício sobre neutrófilos. Entretanto, a corticosterona pode ser responsável pela manutenção da neutrofilia após o exercício de longa duração (PEDERSEN, BRUUNSGAARD, 1995; PEAKE, 2002).

Após a aplicação de glicogênio de ostra na cavidade peritoneal dos ratos, essa substância desencadeia uma resposta inflamatória/infecciosa denominada peritonite. Com isso, os neutrófilos circulantes são estimulados a migrar por diapedese ao peritônio e a medula óssea faz a reposição dessas células na corrente sanguínea (PERES, CURI, 2005). Porém, durante o exercício, esse processo pode promover um efeito pirogênico, ocasionando bloqueamento enzimático e deslocamento do limiar anaeróbico. Outro efeito proveniente da aplicação do glicogênio de ostra é a neutrofilia, que pode ocorrer devido à desmarginação de células que estão acopladas na parede do endotélio e está relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo, frequência cardíaca, pressão arterial e vasodilatação (MACKINNON, TOMASI, 1986; McCARTHY, DALE, 1988; BARRIGA et al., 1993; BRENNER et al., 1998). Nossos resultados demonstraram que todos os grupos exercitados na curta duração e que receberam tratamento com glicogênio de ostra apresentaram neutrofilia (Figura 3B). Observamos também, neutrofilia nos grupos que executaram uma sessão de exercício exaustivo e neutropenia dos grupos que foram adaptados para esta sessão (Figura 8B).

Nos grupos de curta duração que receberam tratamento com glicogênio de ostra antes do exercício, o número total de neutrófilos peritoneais diminuiu somente

nos ratos que nadaram 15 minutos na intensidade leve (Figura 4A). Por outro lado, observamos aumento no grupo 5 minutos em ambas intensidades e 15 minutos de intensidade moderada (Figura 4A). Quanto aos ratos que realizaram exercício exaustivo, observamos neutrofilia nos animais que executaram uma sessão de exercício e neutropenia dos animais que foram adaptados para esta sessão (Figura 8B). Estes resultados podem estar relacionados com os hormônios imunomoduladores liberados em condições de estresse, principalmente catecolaminas e corticosterona (HOST et al., 1995; GARCIA et al., 1999; ORTEGA, 2003). Quanto a redução de neutrófilos peritoneais, podemos explicá-la, talvez, por menor concentração plasmática de catecolaminas induzida pela adaptação ao exercício. Quanto a neutrofilia, pode ser que a maior marginação de neutrófilos para a cavidade peritoneal tenha ocorrido por intermédio da ação da noradrenalina, que age proporcionalmente com a intensidade do exercício (WOODS et al., 1999).

Quanto à capacidade fagocitária, verificou-se nos grupos que realizaram exercício de curta duração e que foram tratados com glicogênio de ostra, redução em neutrófilos peritoneais nos primeiros minutos de exercício físico, provavelmente pelo aumento da concentração plasmática de adrenalina (Figura 4B). Nos grupos que realizaram exercício exaustivo, observamos redução no grupo que executou uma sessão de exercício na intensidade moderada e aumento no grupo que foi adaptado para esta sessão moderada, que pode ter ocorrido devido a menor concentração plasmática de adrenalina e corticosterona (Figura 9B2).

Um estudo realizado com adultos jovens e sedentários, submetidos a 1 hora de exercício realizado a 50% do VO_2 máx, mostrou um aumento espontâneo da mobilidade, quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos com paralela redução da concentração plasmática de cortisol (ORTEGA et al., 1993a). Esta redução na

concentração plasmática de cortisol tem sido notada em exercício com intensidade abaixo de 60% do VO₂ máx (CORNIL et al., 1965; BARRECA et al., 1988; McCARTHY, DALE, 1988). Sugere-se que esta redução no cortisol após este tipo de exercício moderado pode ser responsável por promover melhor capacidade fagocitária em neutrófilos.

A adrenalina é um potente imunomodulador, encontrando-se aumentada no exercício. Este hormônio é capaz de diminuir a capacidade fagocitária de neutrófilos peritoneais *in vitro* (GARCIA et al., 1999). Por outro lado, a noradrenalina parece estimular a funcionalidade de neutrófilos, pois, um estudo com ratos que sofreram inibição simpática demonstrou redução na quimiotaxia e fagocitose em relação aos ratos não operados (CARTER et al., 1992; NAGATOMI et al., 2000).

Vários estudos têm demonstrado aumento da capacidade fagocitária em neutrófilos por até 24 horas após o exercício intenso ou exaustivo em indivíduos não treinados (LEWICKI et al., 1987; RODRÍGUES et al., 1991; PEDERSEN, BRUUNSGAARD, 1995; WYSOCKI et al., 1995). Resultados similares foram encontrados com exercício moderado em pessoas sedentárias e treinadas (ORTEGA et al., 1993a; BLANNIN et al., 1996; MARCHENA et al., 2002). Muitos estudos em ciclistas treinados ou corredores de longa distância durante um período de treinamento moderado não encontraram alterações ou encontraram reduções na capacidade fagocitária em resposta ao exercício exaustivo (LEWICKI et al., 1987; FABRY et al., 1994; HACK et al., 1994; BLANNIN et al., 1996).

Para analisar a viabilidade e a apoptose de neutrófilos circulantes nos grupos tratados com glicogênio de ostra e que realizaram exercício de curta duração, foram observadas: integridade da membrana celular, fragmentação do DNA e o potencial transmembrânico mitocondrial. O percentual de células com fragmentação do DNA

(Figura 5B) e de células com alteração no potencial transmembrânico mitocondrial (Figura 5C) não apresentaram alterações nos grupos exercitados em relação ao controle. Por outro lado, observamos um aumento da viabilidade de neutrófilos nos grupos cinco minutos em ambas intensidades (Figura 5A). Este resultado evidencia que embora a capacidade fagocitária esteja diminuída, a viabilidade foi aumentada. Este fato pode estar relacionado com a forte descarga de adrenalina que ocorre no início do exercício. Garcia et al. (1999) observaram redução da capacidade fagocitária dessas células, devido este hormônio agir diretamente na enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase, assim, reduzindo a produção de NADPH e espécies reativas de oxigênio (ROS). Foi observado por Lagranha et al. (2004) que exercícios agudos com maior duração, 60 minutos em esteira, induziram apoptose em neutrófilos peritoneais. Porém, em nosso protocolo, com exercício de natação com curta duração, os parâmetros apoptóticos avaliados não foram alterados.

Recentemente, NEMET et al. (2005) relataram que a atenuação de fatores anabólicos é acompanhada pelo aumento de mediadores e citocinas, que normalmente estão associadas com estado catabólico, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Os mesmos autores relatam que estas citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas em adultos e crianças após exercício físico, e este aumento está fortemente correlacionado com o aumento de lactato. INGLOT et al. (1999) propuseram uma correlação entre intensidades progressivas de exercício físico, metabolismo de glicose, produção de TNF- α e fadiga. Neste estudo, o TNF- α foi tratado como uma molécula pleiotrópica hipoglicemiante, que age como regulador do metabolismo glicolítico após a exposição do organismo a um patógeno ou lesão. De maneira mecanicista, isso pode ocorrer pelo desvio do fluxo de glicose do músculo para as células do sistema imunológico, desencadeando assim, uma competição pelo

substrato energético e fadiga durante o exercício físico. Observamos em nosso estudo, redução na concentração sérica de TNF- α nos grupos 5 e 15 minutos de intensidade moderada tratados com glicogênio de ostra (Figura 6). Então, podemos supor que este protocolo não foi suficiente para o piruvato ser o aceptor final de elétrons, o que reforça o pressuposto do exercício ter sido executado com predomínio do metabolismo aeróbio. Com isso, a concentração sérica de TNF- α não aumentou, por não existir microlesão ocasionada pelo acúmulo de íons H⁺ intramuscular, o que pode explicar a exaustão do grupo 15 minutos de intensidade moderada tratado com glicogênio de ostra, talvez, por aumento da temperatura corporal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os efeitos do exercício físico de curta duração em diferentes tempos e intensidades sobre o número e capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais em ratos sedentários foram principalmente a manutenção do número e o aumento da capacidade fagocitária nos grupos exercitados na intensidade leve.

O exercício físico de curta duração nas intensidades leve e moderada aumentou o número e a viabilidade de neutrófilos em ratos sedentários. No entanto, a capacidade fagocitária diminuiu. Por outro lado, esses volumes e intensidades não foram capazes de induzir alterações severas como apoptose.

No protocolo de ratos normais, o exercício físico exaustivo de longa duração reduziu o número total de macrófagos peritoneais na sessão de intensidade leve, porém, observamos aumento desta variável após 4 sessões de exercício. No entanto, a capacidade fagocitária aumentou em todos os grupos exercitados. Quanto ao protocolo de ratos que receberam tratamento com glicogênio de ostra antes do exercício, o número total de neutrófilos diminuiu nos grupos de intensidade leve e aumentou nos grupos de intensidade moderada. No entanto, a capacidade fagocitária diminuiu no grupo que realizou uma sessão de exercício moderado e aumentou no grupo adaptado para esta sessão.

Neste contexto, células fagocíticas da imunidade inata de ratos sedentários respondem diferentemente ao estresse causado pelo exercício físico agudo, provavelmente pela ação de forma diferenciada dos hormônios relacionados ao estresse, agindo de maneira inversamente proporcional na adaptação ao exercício físico, quanto às variáveis de número e capacidade fagocitária de neutrófilos e, quanto aos macrófagos, aumentando somente a capacidade fagocitária em todos os grupos exercitados.

De maneira geral, no aspecto da prescrição do treinamento, exercícios físicos devem ter seus efeitos devidamente esclarecidos, pois, a maioria da população é sedentária atualmente e, dependendo do volume e/ou intensidade do protocolo, o exercício pode afetar a competência do sistema imunológico. No entanto, faz-se necessário mais estudos para elucidar a relevância clínica desses resultados.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PODER JS. Citocinas. In: _____. *Imunologia celular e molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap.11, p.235-240, 2003.

ABRASS CK, O'CONNOR SW, SCARPACE PJ, ABRASS IB. Characterization of the α -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J. Immunol.* v.135: p.1338-1341, 1985.

ALI RA, QURESCHI MA, McCORKLE FM. Profile of chicken macrophage function after exposure to catecholamines *in vitro*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* v.166: p.11-25, 1994.

ASGEIRSSON G, BELLANTI J. Exercise, immunology and infection. *Seminars in Adolescent Medicine.* v.3: p.199-204, 1987.

BARRECA T, REGGIANI E, FRANCSCHINI F, BARASTRO G, MESSINA V, MENICHETTI G, ODAGLIA G, ROLANDI E. Serum prolactin, growth hormone and cortisol in athletes and sedentary subjects after submaximal and exhaustive exercise, *J. Sports Med. Phys. Fitness.* v.28: p.89-92, 1988.

BARRIGA C, PEDRERA MI, MAYNAR M, MAYNAR J, ORTEGA E. Effect of submaximal physical exercise performed by sedentary men and women on some parameters of the immune system. *Rev. Esp. Fisiol.* v.49(2): p.79-85, 1993.

BARTON BE. Insights into novel biological activities. *Clin. Immunol. Immunopathol.* v.85: p.16-20, 1997.

BENONI G, BELLAVITE P, ADAMI A, CHIRUMBOLO S, LIPPI G, BROCCO G, GIULINI GM, CUZZOLIN L. Changes in several neutrophil functions in basketball players before, during and after the sports season. *Int. J. Sports Med.* v.16: p.34-37, 1995.

BERNTON EW, BRYANT HU, HOLADAY JW. Prolactin and immune function. In: ADER R, FELTEN DL, COHEN N. *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press: p.403-428, 1991.

BLANNIN AK, CHATWIN LJ, CAVE R, GLEESON M. Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocytic activity in middle aged men. *Br. J. Sports Med.* v.30: p.125-129, 1996.

BRENNER I, SHEK P, SHEPARD R. Infection in athletes. *Sports Med.* v.17: p.86-107, 1994.

BRENNER I, SHEK PN, ZAMECNIK J, SHEPARD RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int. J. Sports Med.* v.19(2): p.130-143, 1998.

CAREN LD. Effects of exercise on the human immune system. Does exercise influence susceptibility to infections? *BioScience.* v.41: p.410-414, 1991.

CARTER L, FERRARI JK, DAVISON JS, BEFUS D. Inhibition of neutrophil chemotaxis and activation following decentralization of the superior cervical ganglia. *J. Leukoc. Biol.* v.51(6): p.597-602, 1992.

CAVAGLIERI CR, NISHIYAMA A, FERNANDES LC, CURI R, MILES EA, CALDER PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and productions of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sciences.* v.73: p.1683-1690, 2003.

CHEN Y, JOHNSON AG. *In vivo* activation of macrophages by prolactin from young and aging mice. *Int. J. Immunopharmacol.* v.15: p.39-45, 1993.

CORNIL A, DE COSTER A, CONPINSKI G, FRANCKSON, JR. The effect of muscular exercise on the plasma cortisol level in man. *Acta Endocrinol.* v.48: p.163-168, 1965.

COSTA-ROSA LF, CURY Y, CURI R. Hormonal control of macrophage function and glutamine metabolism. *Biochem. Cell. Biol.* v.69: p.309-312, 1991.

CURI R. *Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte.* Ed. Sprint, São Paulo, 2000.

CURI R, NEWSHOLME P, NEWSHOLME EA. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.138: p.318-332, 1986.

CURY-BOAVENTURA MF, POMPEIA C, CURI R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. *Clin. Nutr.* v.23(4): p.721-732, 2004.

DALE DA, McCARTHY MM. The leukocytosis of exercise: a review and model. *Sports Med.* v.6: p.333-363, 1988.

DZIEDZIAK W. The effect of incremental cycling on the physiological functions of peripheral blood granulocytes. *Biol. Sport.* v.7: p.239-247, 1990.

DRENTH JP, VAN UUM SH, VAN DEUREN M, PESMAN GJ, VAN DER VEN-JONGEKRIJG J, VAN DER MEER JW. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates *ex vivo* TNF-alpha and IL-1 beta production. *J. Appl. Physiol.* v.79(5): p.1497-1503, 1995.

EKBLOM B, EKBLOM O, MALM C. Infectious episodes before and after a marathon race. *Scand. J. Med. Sci. Sports.* v.16(4): p.287-293, 2006.

FABRY Z, RAINE CS, HART MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol. Today.* v.15: p.218-224, 1994.

FEBBRAIO MA, PEDERSEN BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* v.16: p.1335-1347, 2002.

FITZGERALD L. Exercise and the immune system. *Immunol. Today.* v.9: p.337-339, 1988.

FLESHNER M. Exercise and neuroendocrine regulation of antibody productive effect of physical activity on stress-induced suppression of the specific antibody response. *Int. J. Sports Med.* v.21(suppl): p31-32, 2000.

FORNER MA, BARRIGA C, RODRÍGUEZ AB, ORTEGA E. A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis. *J. Physiol.* v.488(Pt3): p.789-94, 1995.

FORNER MA, BARRIGA C, ORTEGA E. Exercise-induced stimulation of murine macrophages phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J. Appl. Physiol.* v.80: p.899-903, 1996.

FRIMAN G, ILBÄCK NG. Acute infection: Metabolic responses, effects on performance, interaction with exercise, and myocarditis. *Int. J. Sports Med.* v.19: p172-182, 1998.

FROST RA, NYSTROM GJ, LANG CH. Epinephrine Stimulates Interleukin-6 (IL-6) Expression in Skeletal Muscle and C2C12 Myoblasts: Role of Jun NH2-Terminal Kinase and Histone Deacetylase Activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* v.Jan (13), s.p., 2004.

FRY RW, MORTON AR, CRAWFORD GP, KEAST D. Cell numbers and *in vitro* responses of leukocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* v.64: p.218-227, 1992.

GABRIEL H, SCHWARZ L, BORN P, KINDERMANN W. Differential mobilization of leukocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* v.65: p.529-534, 1992.

GARCIA C, PITHON-CURI TC, DE LOURDES FIRMANO M, PIRES DE MELO M, NEWSHOLME P, CURI R. Effect of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. *Clin. Sci.* v.96: p549-555, 1999.

GARCÍA JJ, SÁEZ MC, DE LA FUENTE M, ORTEGA E. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxypheyl-glycol. Role of α - and β -adrenoreceptors. *Mol. Cell. Biochem.* v.254(1-2): p.299-304, 2003.

GHORAYEB N, BARROS T. *O exercício – Preparação Fisiológica, Avaliação Médica, Aspectos Especiais e Preventivos.* Ed. Atheneu, 1999.

GORDON S. Biology of the macrophages. *J. Cell Sci.* v.4: p.267-86, 1986.

GOBATTO CA, DE MELLO MA, SIBUYA CY, DE AZEVEDO JR, DOS SANTOS LA, KOKUBUN E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* v.130(1): p.21-27, 2001.

GRAY AB, TELFORD RD, COLLINS M, BAKER MS, WEIDEMANN MJ. Granulocyte activation induced by intense interval running. *J. Leukocyte Biol.* v.53: p.591-597, 1993.

GUYTON AC, HALL JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 11ª edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2006.

HACK V, STROBEL G, RAU JP, WEICKER H. The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* v.65: p.520-524, 1992.

HACK V, STROBEL G, WEISS M, WEICKER H. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J. Appl. Physiol.* v.77: p.1731-1735, 1994.

HARDMAN AE. Physical activity and cancer risk. *Proc. Nutr. Soc.* v.60(1): p.107-113, 2001.

HARRI M, KUUSELA P. Is swimming exercise or cold exposure for rats? *Acta. Physiol. Scand.* v.126(2): p.189-197, 1986.

HARTMAN G, MICHNA H, SCHANZER W. Cardiac and suprarenal mediators of peritoneal macrophage activity and training. *J. Sports Med.* v.8: p.157-162, 1987.

HEATH GW, FORD ES, CRAVEN TE, MACERA CA, JACKSON KL, PATE RR. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.23: p.152-157, 1991.

HOFFMAN-GOETZ L. Effect of estradiol and exercise on lymphocyte proliferation responses in female mice. *Physiol. Behav.* v.68(1-2): p.169-174, 1999.

HOST CR, NORTON KI, OLDS TS, LOWE EL, MULLIGAN SP. The effects of altered exercise distribution on lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.72: p.157-164, 1995.

ICHINOSE M, ASAI M, SAWADA M. β -endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages. *Scand. J. Immunol.* v.42: p.311-316, 1995.

INGLOT AD, SOBIECH KA, ZIELINSKA-JENCZYLIK J, SYPULA A, MAJDA J, LORENC M. Development and disappearance of tolerance to induction of interferon and tumor necrosis factor response in athletes treated with natural immunostimulant. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* v.40: p.237-244, 1999.

JAVIERRE MQ, PINTO LU, LIMA AO, SASSINE WA. Immunologic phagocytosis by macrophages: effect by stimulation of alpha adrenergic receptors. *Rev. Bras. Pesquisa Méd. Biol.* v.8: p.271-274, 1975.

JONSDOTTIR IH. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: neuropeptides and their interaction with immune function. *Immunol. Cell Biol.* v.78(5): p.562-70, 2000.

JONSDOTTIR IH, SCHJERLING P, OSTROWSKI K, ASP S, RICHTER EA, PEDERSEN BK. Muscle contractions induces interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J. Physiol.* v.528: p.157-163, 2000.

KEAST D, ARSTEIN D, HARPER W, FRY RW, MORTON AR. Depression of plasma glutamine concentration after exercise stress and its possible influence on the immune system. *Med. J. Austr.* v.162: p.15-18, 1995.

KELLER P, KELLER C, CAREY AL, JAUFFRED S, FISCHER CP, STEENSBERG A, PEDERSEN BK. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle autocrine regulation by IL-6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.17;310(2): p550-554, 2003.

KELLY KW. Growth hormone in Immunobiology. In: ADER R, FELTEN DL, COHEN N. *Psychoneuroimmunology.* v.Academic Press: p.377-402, 1991.

KHANSARI DN, MURGO AJ, FAITH RE. Effects of stress on the immune system. *Immunol. Today.* v.11(5): p.170-175, 1990.

KONIG D, GRATHWOHL D, WEINSTOCK C, NORTHOFF H, BERG A. Upper respiratory tract infection in athletes: influence of lifestyle, type of sport, training effort, and immunostimulant intake. *Exerc. Immunol. Rev.* v.6: p.102-120, 2000.

KUROKAWA Y, SHINKAI S, TORII J, HINO S, SHEK PN. Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocyte populations. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.71: p.245-252, 1995.

LAGRANHA CJ, SENNA SM, DE LIMA TM, SILVA EP, DOI SQ, CURI R, PITHON-CURI TC. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.36(2): p.210-217, 2004.

LANCHA-JR AH, RECCO MB, CURI R. Pyruvate carboxylase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. Evidence for stimulating effect of exercise. *Biochem. Mol. Biol. Int.* v.32(3): p.483-489, 1994.

LARRABEE RC. Leucocytosis after violent exercise. *Journal of Medical Research.* v.7: p.76-82, 1902.

LEWICKI R, TCHORZEWSKI H, DENYS A, KOWALSKA M, GOLINSKA A. Effect of physical exercise on some parameters of immunity in conditioned sportmen. *Int. J. Sports Med.* v.8: p.309-314, 1987.

LUO M, FAURE R, TONG YA, DUSSAULT JH. Immunocytochemical localization of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the adult rat: liver, kidney, heart, lung and spleen. *Acta Endocrinol. Copenhag.* v.120: p.451-458, 1989.

MACHA M, SHLAFER M, KLUGER MJ. Human neutrophil hydrogen peroxide generation following physical exercise. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* v.30: p.412-419, 1990.

MACKINNON LT, TOMASI MD. Immunology of exercise. *Annals of Sports Medicine.* v.3: p.1-4, 1986.

MACNEIL B, HOFFMAN-GOETZ L. Chronic exercise enhances *in vivo* and *in vitro* cytotoxic mechanisms of natural immunity in mice. *J. Appl. Physiol.* v.74: p.338-395, 1993.

- MALM C. Susceptibility to infections in elite athletes: the S-curve. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. v.16(1): p.4-6, 2006.
- MARCHENA JM, RODRÍGUES AB, BARRIGA C, ORTEGA E. Effect of moderate exercise on the functional capacity of neutrophils of sedentary individuals. *J. Physiol.* v.543P: p.11P-12P, 2002.
- McARDLE WD, KATCH FL, KATCH VL. *Fisiologia do exercício, energia, nutrição e desempenho humano*. Ed. Guanabara Koogan, 5ª Edição, Rio de Janeiro, 2003.
- McCARTHY D, DALE M. The leukocytosis of exercise. *Sports Med.* v.6: p.333-363, 1988.
- McTIERNAN A, ULRICH C, SLATE S, POTTER J. Physical activity and cancer etiology: associations and mechanisms. *Cancer Causes Control*. v.9(5): p.487-509, 1998.
- MADDEN KS, SANDERS VM, FELTEN DL. Catecholamines influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v.35: p.417-448, 1995.
- MOLDOVEANU AI, SHEPARD RJ, SHEK PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL1 beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J. Appl. Physiol.* v.89(4): p.1499-1504, 2000.
- MUNK A, GUYRE PM. Glucocorticoids and immune function. In: Ader R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. v.Academic Press: p.447-474, 1991.
- MURAGUCHI A, HIRANO T, TANG B, MATSUDA T, HORII Y, NAKAJIMA K, KISHIMOTO T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J. Exp. Med.* v.167: p.332-344, 1988.
- NAGATOMI R, KAIFU T, OKUTSO M, ZHANG X, KANEMI O, OHMORI H. Modulation of the immune system by the autonomic nervous system and its implication in immunological changes after training. *Exerc. Immunol. Rev.* v.6: p.54-74, 2000.
- NASH HL. Can exercise make us immune to disease? *The Physician and Sports Med.* v.14: p.251-253, 1986.
- NEMET D, ROSE-GOTTRON CM, MILLS PJ, COOPER DM. Effect of water polo practice on cytokines, growth mediators, and leukocytes in girls. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.35(2): p.356-363, 2003.
- NEMET D, PONTELLO AM, ROSE-GOTTRON C, COOPER DM. Cytokines and growth factors during and after a wrestling season in adolescent boys. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.36(5): p.794-800, 2004.
- NEWSHOLME EA, CALDER PC. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequence for the whole animal. *Nutrition*. v.13(7-8): p.728-730, 1997.

NEWSHOLME EA, NEWSHOLME P, CURI R. The role of the citric acid cycle in cells of the immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. *Biochem. Soc. Symp.* v.4: p.145-161, 1987.

NEWSHOLME EA, NEWSHOLME P, CURI R. A role for muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. *Nutrition.* v.4: p.261-268, 1988.

NEWSHOLME EA, NEWSHOLME P, CURI R. Glutamine metabolism in different tissues its physiological and pathological importance. In: *Perspectives in Clinical Nutrition.* Ed. KINNEY JM, BORUM PR. Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich, p.71-98, 1989.

NIEMAN DC, JOHANSEN LM, LEE JW, ARABATZIS K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Phys.* v.30: p.316-328, 1990.

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

NIEMAN DC. Immune response to heavy exertion. *American Physiological Society.* s.v.: p.385-1394, 1997.

NIEMAN DC, PEDERSEN BK. Exercise and Immune Function. *Recent Developments. Sports Méd.* v.27(2): p.73-80, 1999.

NIEMAN DC. Exercício, Sistema Imune e Doença Infecciosa. In: GARRET JR., WE KIRKENDALL DT. (org.). *A Ciência do Exercício e dos Esportes.* Porto Alegre: Artmed, p. 202-216, 2003.

NIEMAN DC, HENSON DA, AUSTIN MD, BROWN VA. Immune response to a 30-minute walk. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.37(1): p.57-62, 2005.

NISHIYAMA A, CAVAGLIERI CR, CURI R, CALDER PC. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine inhibits lymphocyte proliferation and decreases interleukin-2 and interferon- γ production from Concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* v.1487: p.50-60, 2000.

ORTEGA E, COLLAZOS ME, BARRIGA C, DE LA FUENTE M. Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* v.64(4): p.323-327, 1992a.

ORTEGA E, COLLAZOS ME, BARRIGA C, DE LA FUENTE M. Effect of physical activity stress on the phagocytic process of peritoneal macrophages from old guinea pigs. *Mech. Ageing. and Dev.* v.65: p.157-165, 1992b.

ORTEGA E, COLLAZOS ME, MAYNAR M, BARRIGA C, DE LA FUENTE M. Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men alter acute moderate exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.66: p.60-64, 1993a.

ORTEGA E, KORNER MA, BARRIGA C, DE LA FUENTE M.. Effect of age and of swimming-induced stress on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from mice. *Mech. Ageing and Dev.* v.70: p.53-63, 1993b.

ORTEGA E, COLLAZOS ME, MAYNAR M, BARRIGA C, DE LA FUENTE M. Study of the phagocytic function of neutrophils from sedentary men after acute moderate exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.66: p.60-67, 1993b.

ORTEGA E. Influence of exercise on phagocytosis. *Int. J. Sports Med.* v.15: p.172-178, 1994.

ORTEGA E, FORNER MA, BARRIGA C. Effect of prolactin on the *in vitro* phagocytic capacity of macrophages. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* v.19: p.139-146, 1996.

ORTEGA E, RODRÍGUES MJ, BARRIGA C, FORNER MA. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *Int. J. Sports Med.* v.17: p.149-155, 1996b.

ORTEGA E, FORNER MA, BARRIGA C. Effect of β -endorphin on adherence, chemotaxis and phagocytosis of *Candida albicans* by peritoneal macrophages. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* v.19: p.267-274, 1996c.

ORTEGA E, FORNER MA, BARRIGA C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. *J. Physiol.* v.498: p.729-734, 1997.

ORTEGA E, FORNER MA, GARCÍA JJ, RODRÍGUEZ AB, BARRIGA C. The influence of β -endorphin on phagocytosis and NBT reduction by murine macrophages. *Biogenic Amines.* v.13: p.285-294, 1997b.

ORTEGA E, FORNER MA, GARCÍA JJ, RODRÍGUEZ AB, BARRIGA C. Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol. Cell. Biochem.* v.201: p.41-47, 1999.

ORTEGA E, MARCHENA JM, GARCÍA JJ, SCHIMIDT A, SCHULZ T, MALPICA I, RODRÍGUEZ AB, BARRIGA C, MICHNA H, LÖTZERICH H. Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol. *J. Appl. Physiol.* v.91: p.1067-1072, 2001.

ORTEGA E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc. Immunol. Rev.* v.9: p.70-93, 2003.

OSTROWSKI K, HERMANN C, BANGASH A, SCHJERLING P, NIELSEN JN, PEDERSEN BK. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J. Physiol.* v.513 (Pt 3): p.889-894, 1998a.

OSTROWSKI K, HERMANN C, BANGASH A, SCHJERLING P, NIELSEN JN, PEDERSEN BK. The sequential release of cytokines in strenuous exercise. *Int. J. Sports Med.*, v.19: p.S216, 1998b.

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.* v.508: p.949-953, 1998c.

OSTROWSKI K, ROHDE T, ASP S, SCHJERLING P, PEDERSEN BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J. Physiol.* v.515(Pt1): p.287-291, 1999.

OSTROWSKI K, SCHJERLING P, PEDERSEN BK. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans – effect of intensity of exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.83: p.512-515, 2000.

PARRY-BILLINGS M, EVANS J, CALDER PC, NEWSHOLME EA. Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet.* v.336: p.523-525, 1990.

PEAKE JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc. Immunol. Ver.* v.8: p.49-100, 2002.

PEAKMAN M, VERGANI D. *Imunologia Básica e Clínica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

PEDERSEN BK, BRUUNSGAARD H. How physical exercise influences the establishment of infection. *Sports Med.* v.19: p.393-400, 1995.

PEDERSEN BK, NIEMAN DC. Exercise immunology: integration and regulation. *Immunol. Today.* v.19(5): p.204-206, 1998.

PEDERSEN BK. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise and cytokines. *Immunol. Cell Biol.* v.78(5): p.532-535, 2000.

PEDERSEN BK, STEENSBERG A, FISCHER C, KELLER C, KELLER P, PLOMGAARD P, FEBBRAIO M, SALTIN B. Searching for exercise factor: is IL-6 a candidate? *J. Muscle Res. Cell Motil.* v.24(2-3): p.113-119, 2003.

PEDERSEN BK, SALTIN B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports.* v.16(Suppl. 1): p.3–63, 2006.

PERES CM, CURI R. *Como cultivar células*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

PETERMANN H, HEYMAN S, VOGL S, DARGEL R. Phagocytic function and metabolite production in tiocetamide-induced liver cirrhosis: a comparative study in perfused livers and cultured Kupffer cells. *J. Hepatol.* v.24: p.468-477, 1996.

PETERS E. Exercise, immunology and upper respiratory tract infections. *Int. J. Sports Med.* v.18: p.S69-S77, 1997.

PLAYFAIR, JHL, LYDYARD PM. *Imunologia Médica*. Ed. Revinter, Rio de Janeiro, 1999.

POWERS SK, HOWLEY ET. *Fisiologia do Exercício: Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho*. 3ª edição. Barueri: Manole, 2000.

PITHON-CURI TC, DE MELO MP, DE AZEVEDO RB, ZORN TM, CURI R. Glutamine utilization by rat neutrophils. Presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am. J. Physiol.* v.273: p.C1124-1129, 1997.

PYNE D. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med.* v.17: p.245-258, 1994.

PYNE DB, BAKER MS, SMITH JA, TELFORD RD, WEIDEMANN MJ. Exercise and the neutrophil oxidative burst: Biological and experimental variability. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* v.74: p.564-571, 1996.

REBELO AN, CANDEIAS JR, FRAGA MM, DUARTE JA, SOARES JM, MAGALHÃES C, TORRINHA JA. The impact of soccer training on the immune system. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* v.8: p.258-261, 1998.

REITER Z. Interferon: a major regulator of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J. Interferon Res.* v.13: p.247-257, 1993.

RIVIER A, PENE J, CHANEZ P, ANSELME F, CAILLAUD C, PREFAUT C, GODARD P, BOUSQUET J. Release of cytokines by Blood Monocytes During Strenuous Exercise. *Int. J. Sports Med.* v.15: p.192-198, 1994.

ROBSON PJ, BLANNIN AK, WALSH NP, CASTELL LM, GLEESON M. Effects of exercise intensity, duration and recovery on *in vitro* neutrophil function in male athletes. *Int. J. Sports Med.* v.20: p.128-135, 1999.

RODRÍGUES AB, BARRIGA C, DE LA FUENTE M. Phagocytic function of blood neutrophils in sedentary young people alter physical exercise. *Int. J. Sports Med.* v.12: p.276-280, 1991.

ROITT I, BROSTOFF J, MALE D. *Imunologia*. Ed. Manole, 6ª edição, Barueri, 2003.

ROWBOTTON D, KEAST D, MORTON AR. The merging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. *Sports Med.* v.21: p.80-97, 1996.

ROWBOTTON DG, GREEN KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.32(Suppl 7): p.S396-S405, 2000.

SAMPAIO-BARROS MM, FARIAS-SILVA E, GRASSI-KASSISSE DM, SPADARI-BRATFISCH RC. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rats. *Stress.* v.6(2): p.127-132, 2003.

SAXTON JM, CLAXTON D, WINTER E, POCKLEY AG. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress but not by exercise-induced muscle damage. *Clin. Sci. (Lond.)*. v.104: p.69-77, 2003.

SERIO M, POTENZA MA, MONTAGNANI M, MANSI G, MITOLO-CHIEPPA D, JIRILLO E. Beta-adrenoceptor responsiveness of splenic macrophages in normotensive and hypertensive rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* v.18: p.24-65, 1996.

SHARP C, PARRY-BILLINGS M. Can exercise damage your health? *New Sci.* s.v.: p.33-37, 1992.

SHARP BM, KEANE WF, SUH JH, GEKKER G, TSUKAYAMA D, PETERSON PK. Opioid peptides rapidly stimulate superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *Endocrinology.* V.117: p.793-795, 1985.

SHEPHARD RJ. *Physical Activity, Training and the Immune Response.* In.: CARMEL. Cooper Publishing Group: pp. 56-64, 169-174, 1997.

SHEPHARD RJ. Exercise, immune function and HIV infection. *J. Sports Med. Phys. Fitness.* v.38(2): p101-110, 1998.

SHEPHARD RJ, GANNON G, HAY JB, SHEK PN. Adhesion molecule expression in acute and chronic exercise. *Crit. Rev. Immunol.* v.20(3): p245-266, 2000.

SHEPHARD RJ. Cytokine responses to physical activity, with particular reference to IL-6: sources, actions, and clinical implications. *Crit. Rev. Immunol.* v.22: p.165-182, 2002.

SIMON HB. Exercise and human immune function. In: ADER R, FELTEN DL, COHEN N. *Psychoneuroimmunology.* v. Academic Press: 869-896, 1991.

SMITH JA, TELFORD RD, MASON IB, WEIDEMANN MJ. Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* v.11: p.179-187, 1990.

SMITH JA, GRAY AB, PYNE DB, BAKER MS, TELFORD RD, WEIDEMANN MJ. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil microbicidal activity. *Am. J. Physiol.* v.270: p.R838-R845, 1996.

SOTHERN MS, LOFTIN M, SUSKIND RM, UDALL JN, BLECKER U. The health benefits of physical activity in children and adolescents: implications for chronic disease prevention. *Eur. J. Pediatr.* v.158(4): p.271-274, 1999.

SPRENGER H, JACOBS C, NAIN M, GRESSNER AM, PRINZ H, WESERMANN W, GEMSA D. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin. Immunol. Immunopathol.* v.63: p.188-195, 1992.

STEINACKER JM, LORMES W, REISSNECKER S, LIU Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.Nov 8: s.p., 2003.

STEENBERG A. The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. *Exerc. Immunol. Rev.* v.(9): p.40-47, 2003.

STITES DP, TERR AL. *Basic human immunology.* New York. Prentice Hall, 1991.

STITES DP, TERR AI, PARSLOW TG. *Imunologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan, 9ª edição, Rio de Janeiro, 2000.

STRAUB RH, MAYER M, KREUTZ M, LEEB S, SCHOLMERICH J, FALK W. Neurotransmitter of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J. Leukoc. Biol.* v.67: p.553-558, 2000.

SUZUKI K, NAGANUMA S, TOTSUKA M, SUZUKI KJ, MOCHIZUKI M, SHIRAISHI M, NAKAJI S, SUGAWARA K. Effects of exhaustive endurance exercise and its one-week daily repetition on neutrophil count and functional status in untrained men. *Int. J. Sports Med.* v.17: p.205-212, 1996.

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.* v.81(4): p.281-287, 2000.

TILG H, DINARELLO CA, MIER JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol. Today.* v.18: p.428-432, 1997.

TSIGOS C, PAPANICOLAOU DA, KYROU I, DEFENSOR R, MITSIADIS CS, CHROUSOS GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v.82: p.4167-4170, 1997.

VAN EPPS DE, SALAND L. Beta-endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear chemotaxis. *J. Immunol.* v.132: p.3046-3053, 1984.

VAN FURTH R, SLUITER W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J. Exp. Med.* v.163(2): p.474-479, 1986.

VOLTARELLI FA, GOBATTO CA, MELLO MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.35(11): p.1389-1394, 2002.

WEIGENT DA, BLALOCK JE. Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J. Leukoc. Biol.* v.58(2): p.137-150, 1995.

WESEMANN W, GEMSA D. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. *Clin. Immunol. Immunopathol.* v.63: p.188-195, 1992.

WILMORE JH, COSTILL DL. *Fisiologia do esporte e do exercício*. 2ª Edição. Manole, 2001.

WOODS JA, DAVIS JM, SMITH JA, NIEMAN DC. Exercise and cellular innate immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.31(1): p.57-66, 1999.

WOODS JA. Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int. J. Sports Med.* v.21: p.S24-S30, 2000.

WYSOCKI H, MINCZYKOWSKI A, WYKRETOWICZ A, JUNICZAK G, SMIELECKI J. Comparison of the influence of stress exercise test and transesophageal cardiac pacing on polymorphonuclear neutrophils functions. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* v.43: p.187-190, 1995.

XING Z, GAULDIE J, COX G, BAUMANN H, JORDANA M, LEI XF, ACHONG MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* v,101: p.311-320, 1998.

ANEXOS

Artigo 1 Submetido ao Journal of Exercise Physiology (JEP)

Influence of short duration acute exercise on the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats.

Clíilton Kraüss de Oliveira Ferreira¹; Jonato Prestes¹; Anelena Bueno Frollini¹; Felipe Fedrizzi Donatto¹; Rodrigo Dias¹; Marcia Grando Guerreschi¹; Sandra Regina Brambilla¹; Maria Fernanda Cury Boaventura²; Tânia Cristina Pithon Curi²; Rui Curi²; Rozangela Verlengia¹; Adrienne Cristinne Palanch¹; Cláudia Regina Cavaglieri¹.

¹ Health Science Faculty, Methodist University of Piracicaba, São Paulo, Brazil.

² Institute of Biomedicals Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Address Correspondence to:

Dra. Cláudia Regina Cavaglieri. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Metodista de Piracicaba. Rodovia do Açúcar, Km 156, 13400-911 – Piracicaba, São Paulo, Brasil, e-mail: ccavagli@unimep.br

Tel. e Fax: 0021-55-19 3124-1515

Influence of short duration acute exercise on the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats.

Abstract

It has been shown that long duration and high intensity exercise promote changes on the immune system. On the other hand, these effects are less clear in short duration exercise. The objective of this study was to determine alterations in the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats after short duration acute exercise (swimming). It was used male Wistar rats divided in the following groups (n=5 per group): a control group and four exercised groups at low and moderate intensities during 5 and 15 minutes. It was observed (p 0.05) peritoneal neutropenia in the low intensity for the 15-minute group ($54 \times 10^6 \pm 3,50$); peritoneal neutrocytosis for the 5-minute group at both intensities (low= $178,8 \times 10^6 \pm 11,41$ / moderate= $73,2 \times 10^6 \pm 3,07$) and for the 15-minute group at moderate intensity ($127,6 \times 10^6 \pm 5,14$); reduction in the phagocytic capacity of peritoneal neutrophils for the 5-minute groups at both intensities (low= $78\% \pm 1,34$ / moderate= $74,8\% \pm 3,02$) and for the 15-minute group at moderate intensity ($63,6\% \pm 2,31$); increasing of the percentile of viable circulating neutrophils for the 5-minute groups at both intensities (low= $96,39\% \pm 0,59$ / moderate= $94,21\% \pm 1$) and for the 15-minute group of low intensity ($92,48\% \pm 0,38$); no differences on apoptotic parameters. In a general way, the prescription of short duration exercises needs to have its effects properly clarified, because most of the people are sedentary nowadays.

Key words: exercise; swimming; immune system; neutrophils; cytokines; TNF- α .

Introduction

Neutrophils constituted of about 60% of the circulating leukocytes in adult human beings and they are the first defense cells in severe inflammatory response, eliminating the microorganisms through the liberation of reactive oxygen species, proteases and enzymatic phagocytes.

The recruitment and activation of neutrophils have been reported in response to the structural damages induced by exercise in skeletal muscles, since physical activity elevates the total number of leukocytes in the blood in a relationship directly proportional to the duration and the intensity of the exercise, especially to the polymorphonuclear (1). Although the number increases after the exercise in direct proportion to the duration and the intensity of exercise, functional alterations have also been described (2). Immediately after exercise of moderate intensity (50-70% VO_{2max}), the neutrophil phagocytic capacity increases and it can stay high for up to 24 hours (2).

Additionally, the liberation of intracellular granules, or degranulation, is associated with the increased concentration of proteolytic enzymes (ex.: elastase) in the plasma and antigens of surfaces (CD11b and CD16) in neutrophils (1). A study observed in sexually immature and in mature male rats showed that physical exercise promoted increased DNA fragmentation, condensation of the chromatin and externalization of the phosphatidylserine in peritoneal neutrophils, which suggests an increasing of the apoptosis of those cells induced by the exercise (3).

Other studies have reported reduced production of reactive oxygen species immediately after exercise of moderate intensity (50-60% VO_{2max}) of short and long duration, as well as of high intensity (80-100% VO_{2max}) until exhaustion (4; 5). This fact has been denominated a "post-exercise refractory period" and suggested as

representing the time that the neutrophils are potentially less responsive to microbial challenges (6). However, other studies with 60-90 minutes of exercise of moderate intensity (50-70% $\text{VO}_2\text{máx.}$) were reported as increasing the production of reactive oxygen species significantly (7; 8).

As the effects of the short duration acute exercise are unclear, the objective of this study was to determine alterations of the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats submitted to acute exercise (swimming) at low and moderate intensities.

Methods

Animals

Male rats of the Wistar lineage were used, 2 months old, with a medium weight of 200g and they were obtained from the central breeding laboratory of the Methodist University of Piracicaba. The animals received water and free feeding (*ad libitum*) and were maintained in collective cages, in atmosphere with constant temperature of $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, and a light/darkness cycle of 12/12 hours in agreement with the guidelines of *American College of Sports Medicine*.

Experimental Groups

The animals were divided into five groups (n=5 for group), these being: a sedentary control group and four groups exercised for 5 and 15 minutes at low and moderate intensities.

Physical Exercise

The physical exercise model chosen was swimming, accomplished in the tank with the water temperature of $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ in the afternoon period. Approximately 4 hours before the exercise, the animals received injection I.P. of 10 ml of a solution of

type II oyster glycogen (2%) in PBS, with the intention of provoking the migration of the circulating neutrophils to the peritoneal cavity (11). After this period, they were submitted just once to the physical exercise (acute study), and the groups exercised at low intensity didn't use additional loads. At the moderate intensity they used a load of 5% of their body weight coupled on their backs, which corresponds to an intensity below the point of inflection of the curve of the lactate threshold (9; 10). The collection of the cells was accomplished immediately after the exercise.

Leukometry and Differential Leukogram

The count of total leukocytes was accomplished with Turkey liquid and counting in a Neubauer Chamber. The differential leukocyte count was accomplished in an optical microscope using blood smear, colored with May-Grünwald and Giemsa.

Total number and Peritoneal Neutrophil Phagocytic Capacity

The total count and phagocytic capacity of peritoneal neutrophils was accomplished according to the methodology described by Curi et al. (1997) (11).

Viability and Apoptosis of Circulating Neutrophils

The fragmentation of DNA, externalization of phosphatidilserine and ionic flow of the mitochondrial membrane were accomplished in a Flow Cytometer, according to Cury-Boaventura et al. (2004) (12).

Serum Dosage of TNF- α

The serum dosage of TNF- α was found by the method of ELISA, according to Cavaglieri et al. (2003) (13).

Statistical Analysis

The statistical analysis was accomplished with the application of the ANOVA test, followed by the Student-t test ($p < 0.05$), always comparing the exercised groups with the control group and, also, the exercised groups to each other with the same volume, the results being expressed as the average \pm standard error of the average.

Results

Leukometry and Differential Leukogram (Figure 1)

Leukometry. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, it was observed a significant increasing in the leukometry in all the exercised groups. In the comparison among groups, it was found no statistical differences.

Differential Leukogram. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, we observed a significant increasing in the percentile of neutrophils in all the exercised groups. It was also observed a significant increase in the percentile of monocytes of the 5-minute group at moderate intensity. In the comparison between groups, it was found an increase of neutrophils of the 5-minute group at low intensity and no statistical differences for monocytes.

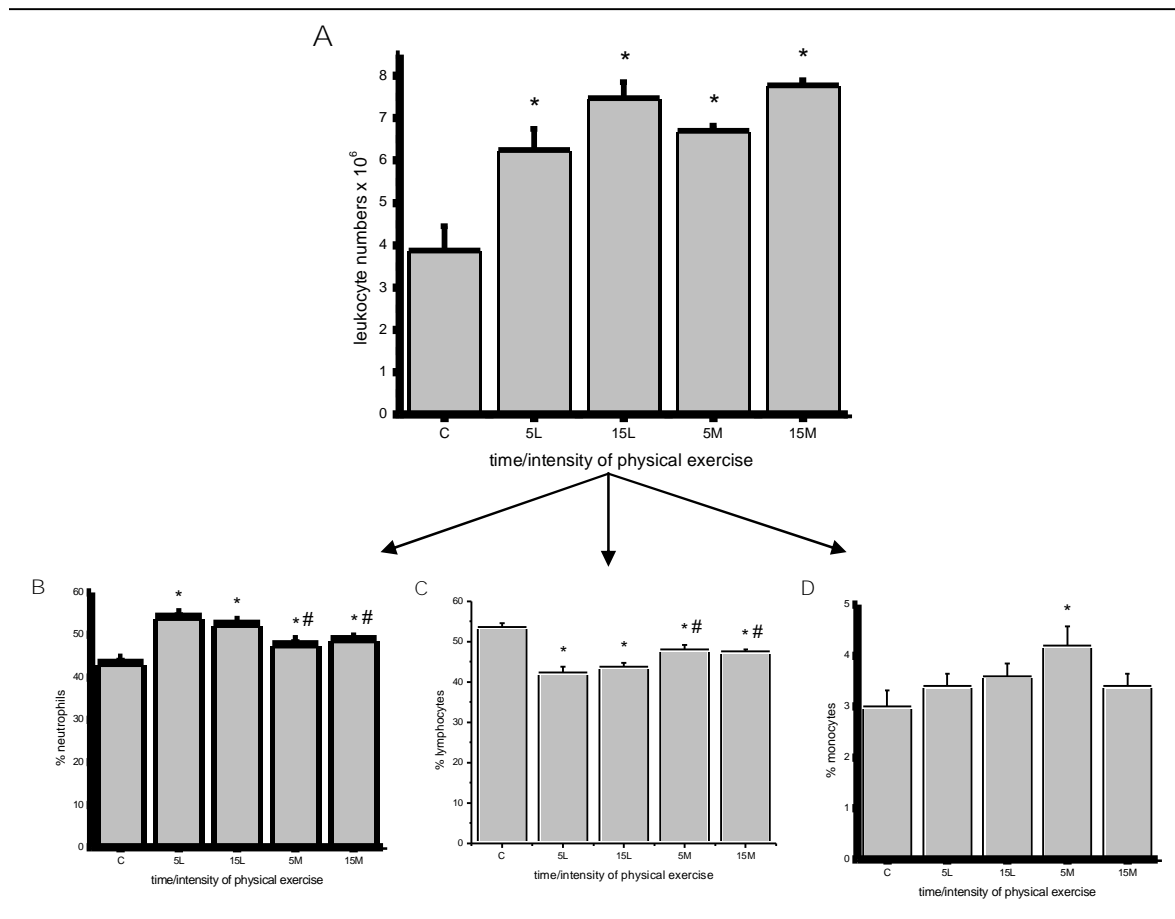


Figure 1. Leukometry (A) and Differential Leukogram with the percentile of circulating neutrophils (B), lymphocytes (C) and monocytes (D). The results were expressed as average of the number of leukocytes and percentile of cells \pm standard error of the average * $p < 0.05$, when compared with the group control; # $p < 0.05$ when the comparison is made among the groups. C = sedentary controls; 5L = 5 minutes of vigorous exercise at low intensity; 15L = 15 minutes of vigorous exercise at light intensity; 5M = 5 minutes of vigorous exercise at moderate intensity; 15M = 15 minutes of vigorous exercise at low intensity.

Total number and Peritoneal Neutrophil Phagocytic Capacity (Figure 2)

Total number of peritoneal neutrophils. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, we observed a significant reduction in the total number of peritoneal neutrophils in the 15-minute group at low intensity. On the other hand, we noticed a significant increasing of that in the 5-minute group in both intensities and 15-minute group at the moderate intensity. In the comparison among groups, we noticed an increasing of that in the 5-minute group at low intensity, and in the 15-minute group at moderate intensity (Figure 2).

Phagocytic capacity of peritoneal neutrophils. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, we observed a significant reduction in the phagocytic capacity of peritoneal neutrophils in the 5-minute groups at both intensities and in the 15-minute group at the moderate intensity. In the comparison among groups, we found no statistical differences (Figure 2).

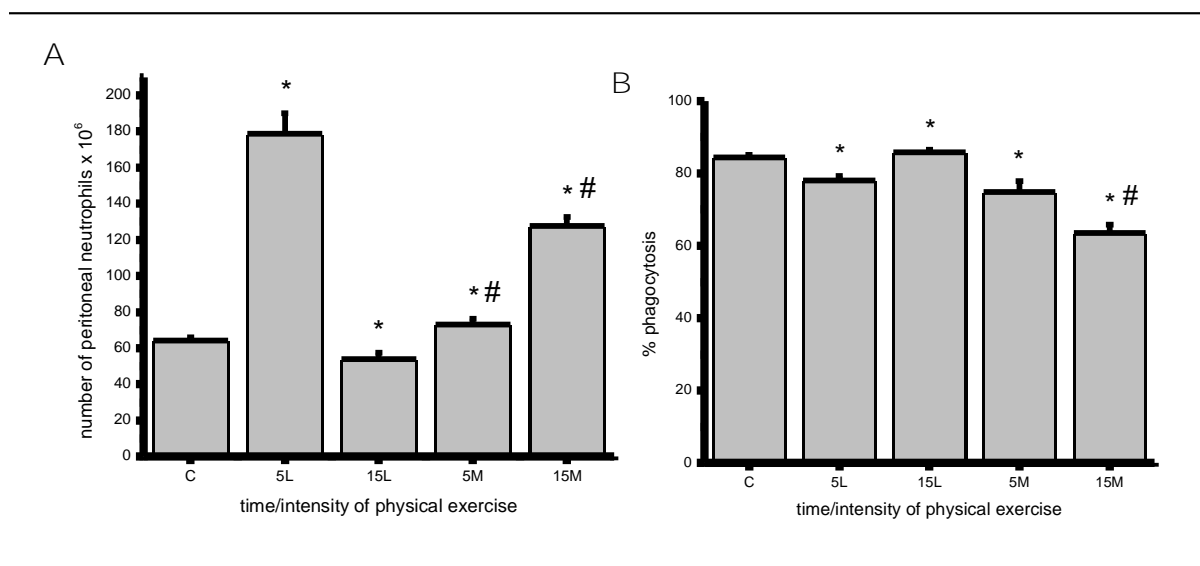


Figure 2. *Total number (A) and Peritoneal Neutrophil Phagocytic Capacity (B)*. The results were expressed as average of the total number of neutrophils and percentile of phagocytosis \pm standard error of the average * $p < 0.05$, when compared with the group control; # $p < 0.05$ when the comparison is made among the groups. C = sedentary controls; 5L = 5 minutes of vigorous exercise at low intensity; 15L = 15 minutes of vigorous exercise at light intensity; 5M = 5 minutes of vigorous exercise at moderate intensity; 15M = 15 minutes of vigorous exercise at low intensity.

Viability and Apoptosis of Circulating Neutrophils (Figure 3)

Viability. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, we observed a significant increasing in the viability of circulating neutrophils in the 5-minute groups at both intensities and in the 15-minute group of the low intensity. In the comparison among groups, we did not notice statistically significant differences (Figure 4).

DNA Fragmentation. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group and between groups, we did not observe statistically significant differences in the DNA fragmentation of circulating neutrophils in any of the groups (Figure 4).

Mitochondrial Transmembrane Potential. When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group and between groups, we observed no statistically significant differences in the percentile of rhodamine of the circulating neutrophils in any of the groups (Figure 4).

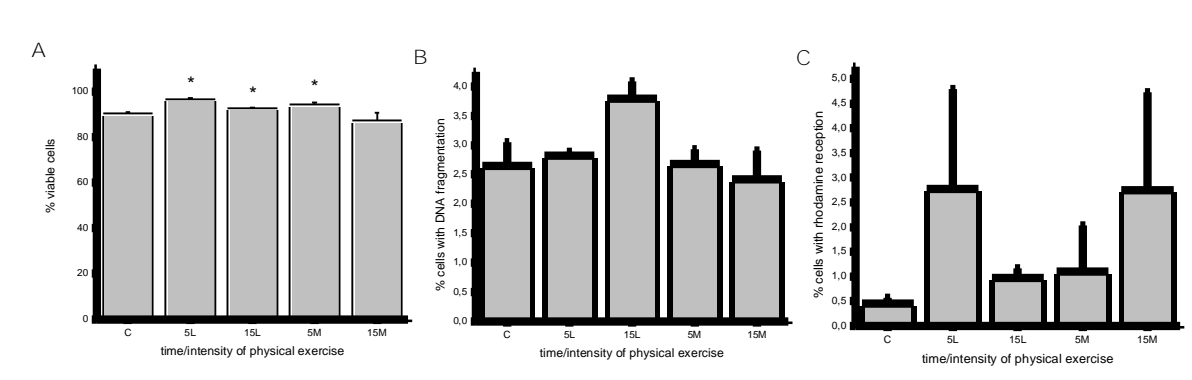


Figure 3. *Viability (A), DNA Fragmentation (B) and Mitochondrial Transmembrane Potential (C) of Circulating Neutrophils.* The results were expressed as average of the percentile of viable cells, cells with DNA fragmentation and cells with rhodamine reception \pm standard error of the average * $p < 0.05$, when compared with the control group; # $p < 0.05$ when the comparison is made among the groups. C = sedentary controls; 5L = 5 minutes of vigorous exercise at low intensity; 15L = 15 minutes of vigorous exercise at light intensity; 5M = 5 minutes of vigorous exercise at moderate intensity; 15M = 15 minutes of vigorous exercise at low intensity.

Serum concentration of TNF- α (Figure 4)

When the exercised groups of low and moderate intensities were compared with the control group, we observed a significant decreasing in the serum concentration of TNF- α in the 5 and 15-minute groups at moderate intensity. We also observed a significant reduction in the 15-minute group at moderate intensity when we compared with low intensity group (Figura 4).

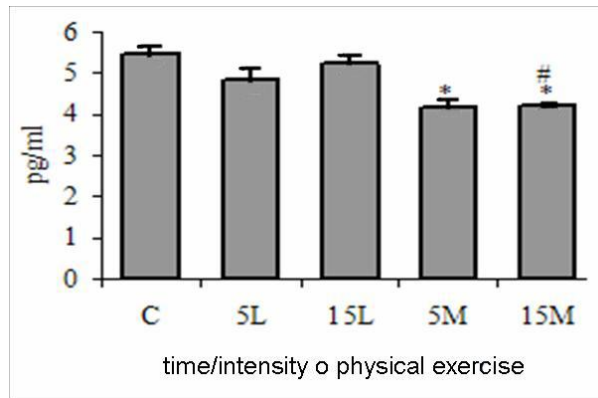


Figure 4. Serum concentration of TNF- α . The results were expressed as average of serum concentration of TNF- α \pm standard error of the average * $p < 0.05$, when compared with the control group; # $p < 0.05$ when the comparison is made among the groups. C = sedentary controls; 5L = 5 minutes of vigorous exercise at low intensity; 15L = 15 minutes of vigorous exercise at light intensity; 5M = 5 minutes of vigorous exercise at moderate intensity; 15M = 15 minutes of vigorous exercise at low intensity.

Discussion

The effect of leukocytosis is well reported immediately after exercise (1). Acute exercise induces to an increasing in the number of neutrophils that returns to the normal values after 24 hours of resting (without exercise) (14; 15; 16). The increasing in the number of neutrophils was observed during and immediately after several types of exercises in several intensities and durations, and this fact can be related to the alterations in the catecholamine concentration and to the mobilization of the bone marrow in response to the high cortisol (15). Besides, the magnitude of the neutrophilia is dependent on the intensity and on the duration of the exercise (15). Our results demonstrated that all the exercised groups presented leukocytosis accompanied by an increasing of neutrophils (Figure 1).

The total number of peritoneal neutrophils decreased in the 15-minute group at low intensity (Figure 2). On the other hand, we observed an increasing in the 5-minute groups at both intensities and in the 15-minute group at the moderate intensity (Figure 2). These results can be related to marginal pool redistribution of the immune cells mediated by immunomodulator hormones liberated in stress conditions, mainly catecholamines and glucocorticoids (17; 14; 18).

Adrenaline is a potent immunomodulator, increased in the first minute of exercise. This hormone is capable of reducing the phagocytic capacity of peritoneal neutrophils *in vitro* (17). In this study the decreasing of the phagocytic capacity of peritoneal neutrophils was also observed in the 5 and 15-minute groups at moderate intensity (Figure 2).

To analyze the viability and the apoptosis of circulating neutrophils, the fragmentation of DNA, and the ionic flow of the mitochondrial membrane were observed. The percentile of cells with DNA fragmentation (Figure 3 B) and cells with alteration in the mitochondrial transmembrane potential (Figure 3 C) didn't show alterations in the exercised groups in relation to the control group. On the other hand, we observed an increasing of neutrophil viability in the 5-minute groups at both intensities (Figure 3 A). This result evidences that although the phagocytic capacity was decreased, the viability was increased. This fact can be related to strong adrenaline discharge that happens at the beginning of the exercise. In this way, a study observed a decreasing of the phagocytic capacity of those cells, due to this hormone acting directly in the enzyme glucose-6-phosphate-desidrogenase, thus reducing the production of NADPH and reactive oxygen species (ROS) (17). It was observed in another study that vigorous exercise with larger duration, 60 minutes on a conveyor, induced apoptosis in peritoneal neutrophils. However, in our protocol,

with swimming exercise of short duration, the apoptotic parameters appraised were not altered (3).

Recently, it was reported that the attenuation of anabolic factors is accompanied by the increasing of mediators and cytokines, that are usually associated with the catabolic state, like TNF- α , IL-6 and IL-1 β (19). The same authors reported that these pro-inflammatory cytokines were increased in adults and children after physical exercise, and this increasing was strongly correlated to the lactate increasing (20). However, the same research group observed in healthy girls (14 and 16 years old) after one session of water polo, with duration of 1.5 hour, a decreasing of TNF- α levels after the exercise (around 3.8%) (20). On the other hand, another study didn't observe any changes of these cytokines (21). It has been proposed a correlation between progressive intensities of physical exercise and production of TNF- α (22). We observed, in our protocol, a decreasing in the serum concentration of TNF- α after 5 and 15-minute groups of moderate exercise (Figure 4). Thus, we can suppose that since after short duration acute exercise can induce alterations in some pro-inflammatory cytokines that could promote alteration of muscular and immune system metabolisms (23; 24; 25).

Conclusions

In a general way, the short duration acute exercise at low and moderate intensities increases the number and viability of neutrophils in sedentary rats. However, the phagocytic capacity was reduced. On the other hand, this volume and intensity were not capable of inducing more severe alterations such as apoptosis. Therefore, the prescription of short duration exercises needs to have its effects properly clarified, because most of the people are sedentary nowadays.

Acknowledgement

We acknowledged FAPESP, PIBIC/CNPq, FAPIC/UNIMEP, FAP/UNIMEP and CAPES/PROSUP by the financial support and all the people that participated direct or indirectly in this research.

References

1. Rowbottom DG, Green KJ. Acute exercise effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32(7 Suppl):S396-405.
2. Blannin AK, Chatwin LJ, Cave R, Gleeson M. Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocytic activity in middle aged men. *Br J Sports Med* 1996;30(2):125-9
3. Lagranha CJ, Senna SM, de Lima TM, Silva EP, Doi SQ, Curi R et al. Beneficial effect of glutamine on exercise-induced apoptosis of rat neutrophils. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(2):210-7.
4. Pyne DB, Baker MS, Smith JA, Telford RD, Weidemann MJ. Exercise and the neutrophil oxidative burst: biological and experimental variability. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996;74(6):564-71.
5. Robson PJ, Blannin AK, Walsh NP, Castell LM, Gleeson M. Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med* 1999;20(2):128-35.
6. Pyne DB. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med* 1994;17(4):245-58.
7. Smith JA, Gray AB, Pyne DB, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 2):R838-45.
8. Suzuki K, Naganuma S, Totsuka M, Suzuki KJ, Mochizuki M, Shiraishi M et al. Effects of exhaustive endurance exercise and its one-week daily repetition on neutrophil count and functional status in untrained men. *Int J Sports Med* 1996;17(3):205-12.

9. Gobatto CA, de Mello MA, Sibuya CY, de Azevedo JR, dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130(1):21-7.
10. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(11):1389-94.
11. Curi TC, de Melo MP, de Azevedo RB, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils. *Biochem Soc Trans* 1997;25(2):249S.
12. Cury-Boaventura MF, Pompeia C, Curi R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. *Clin Nutr* 2004;23(4):721-32.
13. Cavaglieri CR, Nishiyama A, Fernandes LC, Curi R, Miles EA, Calder PC. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro- and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci* 2003;73(13):1683-90.
14. Pedersen BK, Nieman DC. Exercise immunology: integration and regulation. *Immunol Today* 1998;19(5):204-6.
15. McCarthy DA, Dale MM. The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 1988;6(6):333-63.
16. Nieman DC, Henson DA, Austin MD, Brown VA. Immune response to a 30-minute walk. *Med Sci Sports Exerc* 2005;37(1):57-62.
17. Garcia C, Pithon-Curi TC, de Lourdes Firmano M, Pires de Melo M, Newsholme P, Curi R. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. *Clin Sci (Lond)* 1999;96(6):549-55.

18. Ortega E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev* 2003;9:70-93.
19. Nemet D, Pontello AM, Rose-Gottron C, Cooper DM. Cytokines and growth factors during and after a wrestling season in adolescent boys. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(5):794-800.
20. Nemet D, Rose-Gottron CM, Mills PJ, Cooper DM. Effect of water polo practice on cytokines, growth mediators, and leukocytes in girls. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35(2):356-63.
21. Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q et al. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2000;81(4):281-7.
22. Inglot AD, Sobiech KA, Zielinska-Jencylik J, Sypula A, Majda J, Lorenc M. Development and disappearance of tolerance to induction of interferon and tumor necrosis factor response in athletes treated with natural immunostimulant. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1999;47(4):237-44.
23. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil* 2003;24(2-3):113-9.
24. Steinacker JM, Lormes W, Reissnecker S, Liu Y. New aspects of the hormone and cytokine response to training. *Eur J Appl Physiol* 2004;91(4):382-91.
25. 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.

Piracicaba, São Paulo, Brazil

2005/09/23

From: PhD Cláudia Regina Cavaglieri

To: Journal of Exercise Physiology

The manuscript "Influence of short duration acute exercise on the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats" is original and unpublished material, except in abstract form, and is not under consideration by another journal.

Respectfully,

PhD Cláudia Regina Cavaglieri – Lead Author

Health Science Faculty, Methodist University of Piracicaba, São Paulo, Brazil.

CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS APÓS
EXERCÍCIO DE CURTA DURAÇÃO EM RATOS SEDENTÁRIOS

Ferreira, C. K. O.,¹ Prestes, J.,² Donatto, F. F.,¹ Vieira, W. H. B.,² Dias, R.,¹ Frollini, A. B.,¹ Palanch, A. C.,¹ Perez, S. E. A.² e Cavaglieri, C. R.¹

¹ PPG-Educação Física, Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, Piracicaba, SP.

² Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP.

- Instituição de trabalho: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP, Piracicaba, SP.

Rodovia do Açúcar, Km 156, CEP 13400-911, Piracicaba, SP.

- Endereço para correspondência: Jonato Prestes. Curso de Mestrado em Educação Física, Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP, Piracicaba, SP. Rodovia Washington Luiz, Km 235 - Monjolinho – São Carlos-SP, CEP: 13565-905. Email: jonatop@gmail.com

- Título para as páginas do artigo: **Capacidade Fagocitária e Exercício de curta duração.**

- Palavras-chave: **exercício físico; sistema imunológico; macrófagos, capacidade fagocitária; Fisioterapia.**

- Key words: **exercise physical; system immune; macrophages; fagocity capacity; Physical Therapy.**

- Apoio financeiro do PIBIC/CNPQ, CAPES/PROSUP e FAP/UNIMEP

RESUMO

Contextualização: A Fisioterapia é uma área de conhecimento que apresenta o exercício físico como um de seus diversos recursos terapêuticos. O exercício de longa duração e alta intensidade promove alterações no sistema imunológico. No entanto, esses efeitos são menos claros no exercício físico de curta duração.

Objetivo: O propósito desse estudo foi analisar os efeitos do exercício físico de natação de curta duração em diferentes tempos e intensidades sobre leucócitos totais, número e capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais em ratos sedentários.

Método: Foram utilizados ratos Wistar ($n=30$, $n=6$ por grupo), divididos em grupo controle sedentário (C); grupos exercitados 5 minutos na intensidade leve ou moderada (5L e 5M, respectivamente); grupos exercitados 15 minutos na intensidade leve ou moderada (15L e 15M, respectivamente). Os animais foram submetidos ao exercício físico apenas uma vez. Foram analisados: contagem total de leucócitos, monócitos circulantes, número e capacidade fagocitária de macrófagos teciduais. Foram utilizados os testes ANOVA e Tukey com $p < 0.05$.

Resultados: Foi observado aumento nos leucócitos totais nos animais dos grupos exercitados; aumento do número de macrófagos peritoneais nos animais que executaram 15 minutos de exercício moderado e da capacidade fagocitária dos animais que executaram 5 e 15 minutos de exercício leve ($p < 0.05$).

Conclusões: Esses dados sugerem que o exercício físico de curta duração promove um aumento na capacidade fagocitária, fato este de extrema importância do ponto de vista preventivo e terapêutico, no que se refere à intervenção numa

população sedentária bem como naqueles envolvidos na reabilitação e no esporte, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A fisioterapia é uma área de atuação que em sua prática diária utiliza o exercício físico como ferramenta importante de intervenção tanto do ponto de vista preventivo quanto terapêutico. Assim, para alguns profissionais da área da saúde, em destaque o fisioterapeuta, o professor de educação física e o médico do esporte, aspectos envolvendo o exercício físico se fazem necessários para serem investigados como objeto de estudo, particularmente, os relacionados ao sistema imunológico considerando a importância deste frente às respostas ao exercício.

Assim, intensidade, duração e frequência do exercício exercem papel chave na determinação das respostas imunes a um esforço, podendo aumentar ou reduzir a função imune¹⁻⁴. Essas respostas são altamente dependentes da habilidade dos leucócitos em migrarem do sangue para os tecidos periféricos em locais de inflamação. A migração, rolamento, ativação e forte adesão dos leucócitos compreendem o clássico paradigma do recrutamento inflamatório celular⁵.

O exercício tem sido relacionado com benefícios a saúde. De fato, existem evidências mostrando que isto pode ser realmente verdade, porém, o volume e a intensidade são fatores críticos²⁻⁵. Enquanto o exercício moderado regular é muito comumente associado com a redução da susceptibilidade a infecções, o exercício exaustivo tem sido associado com sintomas de imunossupressão transitória, com aumento da susceptibilidade a infecções²⁻¹⁰.

Neste contexto, o estresse induzido pelo exercício pode estimular a capacidade fagocitária de macrófagos e neutrófilos ^{11,12}. A estimulação geral da fagocitose e outros mecanismos durante o exercício físico podem contrabalançar a redução da atividade linfóide, prevenindo a entrada e sobrevivência de microrganismos em situações onde as respostas específicas são deprimidas ¹³. Em alguns casos, este comportamento é também mediado pelas catecolaminas e glicocorticóides, ambos imunossupressivos em linfócitos ^{14, 15}. O papel mediador dos glicocorticóides pode também diferir nas funções não específicas dos macrófagos, como a quimiotaxia e a fagocitose, assim como também, aquelas mais específicas como apresentação de antígenos ^{16, 17}. Outros hormônios como os da tireóide, prolactina, do crescimento (GH) e endorfinas contribuem em geral nos efeitos do estresse ao exercício sobre a fagocitose ^{22, 23}. Neutrófilos e monócitos podem ainda ser estimulados por catecolaminas ou sinais simpáticos ¹⁸⁻²⁰.

Baseados nesses conceitos, o objetivo desse estudo foi analisar os efeitos do exercício físico de curta duração em diferentes tempos e intensidades sobre leucócitos, número e capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais em ratos sedentários.

METODOLOGIA

Animais: Todo o experimento foi conduzido de acordo com a política para pesquisas com animais de experimentação do *American College of Sports Medicine*. Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mamalia*), com dois meses de idade, obtidos do biotério Central da Universidade Metodista de Piracicaba. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com temperatura constante de 23°C ± 2°C e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com luz acesa a partir das seis horas, e mantidos

em gaiolas coletivas (três animais por gaiola). Antes de iniciar o período experimental, os animais permaneceram por 48 horas em adaptação às condições do biotério de pesquisa.

Grupos Experimentais: Os animais foram divididos em cinco grupos (n=6 por grupo), sendo estes: (1) grupo controle sedentário (C); (2) grupo exercitado 5 minutos na intensidade leve (5L); (3) grupo exercitado 15 minutos na intensidade leve (15L); (4) grupo exercitado 5 minutos na intensidade moderada (5M) e (5) grupo exercitado 15 minutos na intensidade moderada (15M).

Protocolo experimental: O exercício físico utilizado foi à natação, sendo realizada em um tanque com a temperatura de 32°C. Para realização do exercício na intensidade moderada, cargas adicionais com 5% do peso corporal dos animais foram acopladas em suas regiões dorsais, o que corresponde a uma intensidade abaixo do limiar anaeróbio^{24, 25}, sendo que no exercício de intensidade leve não se fez uso de cargas adicionais. Os animais dos grupos experimentais foram submetidos separadamente ao exercício físico e sacrificados de 3 a 4 minutos após o final das sessões de exercício, para análise das variáveis sanguíneas e teciduais, as quais foram realizadas no mesmo período do dia (entre 14 e 17 horas). Vale destacar que os animais de todos os grupos, incluindo o grupo controle, foram submetidos à mesma influência do ritmo circadiano hormonal, visando com isso minimizar possíveis alterações fisiológicas decorrentes de coletas realizadas em momentos diferentes do dia.

Leucócitos totais: Após o sacrifício dos animais, o sangue foi colhido em tubo de vidro que continha EDTA (100 µl para 3,5 ml de sangue); Uma alíquota de 10 µL do sangue foi retirada, colocada em um tubo de plástico e acrescentado 190 µL do corante TURKEY (Sigma, St. Louis, MO, USA). Com pipeta o tubo foi homogeneizado

e a câmara de Neubauer foi preenchida, sendo realizada à contagem total dos leucócitos no microscópio. Os resultados foram expressos $\times 10^6$, seguindo as descrições de Dornfest et al. ²⁶.

Contagem de monócitos: O sangue foi colhido em tubo de vidro que continha EDTA. Foi realizado o esfregaço, a lâmina foi seca a temperatura ambiente (2 a 3 minutos) sendo feita a coloração (3ml MAY GRUNWALD e GIEMSA (corantes) (Sigma, St. Louis, MO, USA); após a secagem a leitura foi procedida no aparelho LEUCOTRON TP. Esta metodologia foi realizada acompanhando as especificações propostas por Dornfest et al. ²⁶.

Macrófagos peritoneais: Os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade intraperitoneal, após uma lavagem com 6mL de PBS com pH de 7.2, conforme descrito por Pithon-Curi et al. ²⁷.

Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais: Macrófagos foram incubados com 10mL de PBS contendo zymosan (35mg do extrato em 100mL de PBS, Cat. No. Z-7250, Sigma, St. Louis, MO USA) por 30 minutos a 37°C. O processo foi interrompido, colocando-se as placas no gelo por 10 minutos. A porcentagem da fagocitose foi determinada por contagem em câmara de Neubauer, pelo número de células que fagocitaram três ou mais partículas de zymosan de acordo com as descrições metodológicas de Pithon-Curi et al. ²⁷.

Análise Estatística: Todos os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM). A análise estatística foi realizada inicialmente pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e pelo teste de homocedasticidade (critério de Bartlett). Para as variáveis analisadas, que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi utilizado a ANOVA e teste F sendo que, quando a diferença apresentada era significativa, aplicou-se o teste de TUKEY para as comparações

múltiplas. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). O software utilizado em todos os testes estatísticos foi o Statistica[®] 6.1.

RESULTADOS

Leucócitos totais e número de monócitos.

Quando realizada a comparação dos grupos exercitados em curta duração nas intensidades leve e moderada com o grupo controle, foi possível observar um aumento significativo nos leucócitos totais em todos os grupos exercitados, sendo estes aumentos de 111%, 130,6%, 204,85% e 181,8% para os grupos 5L, 15L, 5M e 15M ($p=0,0028$, $p=0,0004$, $p=0,00001$ e $p=0,00002$), respectivamente. Na comparação entre grupos exercitados, foi constatada leucocitose estatisticamente significativa no grupo que se exercitou por cinco minutos na intensidade moderada em relação ao grupo cinco minutos na intensidade leve, sendo este valor 44,53% maior ($p = 0,0244$) (Figura 1A).

Na contagem de monócitos, foi observado aumento de 68,42% e 84,21% nos grupos 5L e 15L ($p=0,0008$ e $p=0,0001$), respectivamente em relação ao controle. Na comparação entre os grupos experimentais, foi observado redução de 52,38% no percentual de monócitos circulantes no grupo 5M em relação ao grupo 5L ($p=0,0052$), bem como, no grupo 15 minutos exercitado na intensidade moderada, o qual apresentou menor percentual de monócitos em relação ao grupo que utilizou a intensidade leve (169,23%, $p=0,00008$) (Figura 1B).

Número Total e Capacidade Fagocitária de Macrófagos:

Foi observado aumento significativo de 32,68% no número total de macrófagos peritoneais no grupo 15M em relação ao controle ($p=0,0012$). Na comparação entre os grupos exercitados, foi observada redução estatisticamente

significante nos macrófagos teciduais somente no grupo cinco minutos moderado em relação a cinco minutos leve (34%, $p=0,0021$) (Figura 2A). Na capacidade fagocitária, foi observado aumento significativo de 7% e 11,26% nos grupos 5L e 15L ($p=0,0017$ e $p=0,00001$), respectivamente, quando comparados com o controle. Na comparação entre grupos, foi constatada capacidade fagocitária 6,4% menor no grupo cinco minutos moderado em relação ao grupo que se exercitou na mesma duração em intensidade leve ($p=0,0032$) (Figura 2B).

DISCUSSÃO

A leucocitose ocorre em resposta ao estresse físico agudo, assim como em exercícios físicos intensos e de curta duração, sendo um fenômeno bem documentado na literatura ²⁹. Os efeitos deste tipo de exercício físico sobre o aumento no número de leucócitos circulantes são mediados, pelo menos em parte, pela ativação do sistema nervoso simpático ³⁰ e aumento agudo da concentração plasmática de catecolaminas durante o exercício ³². A leucocitose pode aumentar linearmente de acordo com a elevação da intensidade do exercício, que poderá também promover maior resposta das catecolaminas ²⁹⁻³².

Esta leucocitose induzida pelo exercício físico foi encontrada em nosso trabalho, por meio dos aumentos significantes detectados no número de leucócitos totais circulantes em todos os grupos exercitados quando comparado ao grupo controle não exercitado. Corroborando com os autores apresentados ²⁹⁻³², os grupos 5 e 15 minutos que utilizaram intensidade maior (moderada), apresentaram leucocitose percentualmente maior em relação aos grupos de intensidade leve.

Os monócitos são precursores dos macrófagos na circulação e estes podem ser encontrados livres ou marginados ³³. Em resposta ao exercício agudo, o número de monócitos aumenta como resultado da desmarginação mediada por

catecolaminas ^{10,18}. Neste estudo, o percentual de monócitos aumentou somente nos grupos exercitados na intensidade leve.

O exercício extenuante diminui o número de macrófagos peritoneais em ratos e a magnitude deste efeito é positivamente correlacionada com a concentração de corticosterona plasmática ¹¹. Para entender a relevância fisiológica dos glicocorticóides em mediar os efeitos do exercício sobre o número total de macrófagos peritoneais, a resposta com diferentes concentrações de corticosterona foi mensurada em ratos ³⁴. Parece existir uma concentração fisiológica na qual os glicocorticóides podem estimular macrófagos, de acordo com a idéia de que baixas concentrações de glicocorticóides podem realçar a imunidade ao invés de suprimi-la ^{8, 13, 30, 34}. A inibição da função de monócitos e macrófagos requer que o fagócito mononuclear seja exposto a uma saturação de 50% ou maior dos receptores de glicocorticóides disponíveis por pelo menos 24 horas ¹.

Nesse estudo encontrou-se aumento na quantidade de macrófagos peritoneais no grupo que realizou o exercício durante 15 minutos em intensidade moderada, quando comparado ao grupo controle, conforme encontrado por Ortega ¹. Além disso, foi encontrada maior capacidade fagocitária nos grupos exercitados cinco e quinze minutos em intensidade leve, conforme encontrado por outros autores ^{11, 13, 18}. O exercício pode modular o número e a função das células do sistema imune inato, neste caso aumentando a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais no exercício de curta duração e intensidade leve. O aumento na concentração plasmática de glicocorticóides, catecolaminas, prolactina, hormônios da tireóide e â-endorfinas podem aumentar a capacidade fagocitária de macrófagos, sendo que, estas substâncias podem ser estimuladas pelo exercício físico ¹. Neste sentido, Ortega et al. ²¹ ao avaliarem ciclistas durante todo período competitivo

observaram um aumento na capacidade fagocitária em relação aos valores basais. Adicionalmente, o aumento da capacidade fagocitária em ciclistas mostrou forte correlação com as concentrações plasmáticas de catecolaminas. Estes dois parâmetros em conjunto são considerados bons indicadores da função imunológica, não apenas em atletas, como também na população em geral. Corroborando com estes resultados, foi encontrado que atletas de basquetebol possuem maior capacidade fagocitária do que indivíduos sedentários³⁵. Desta forma, a intensidade do exercício físico se mostra um fator determinante da função imunológica, sendo esta resposta diferente dependendo da população envolvida.

Embora não tenha aumentado o número total de macrófagos peritoneais, o exercício físico de curta duração na intensidade leve aumentou a capacidade fagocitária dessas células. Possivelmente, os efeitos de outras sessões de curta duração podem auxiliar no aumento da proteção imunológica do organismo, não como adaptação crônica, mas como efeitos agudos somados, visto que, a capacidade fagocitária de macrófagos constitui um passo importante na primeira linha de defesa imune contra agentes infecciosos.

Nesse contexto, no presente estudo foi evidenciado que a intensidade leve se mostrou mais eficiente em aumentar a capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais em relação à intensidade moderada, como também verificado por Ortega et al.³⁶, diferentemente do que pode ser encontrado em atletas^{21, 35}. Este resultado é interessante, pois pode ser utilizado como parâmetro na aplicação do exercício físico para indivíduos sedentários e/ou portadores de patologias limitantes, fato este de extrema importância para fisioterapia.

CONCLUSÕES

O exercício agudo de curta duração, na intensidade leve e moderada induziu a leucocitose, sendo que esta foi mais elevada de acordo com o aumento na intensidade do exercício. Este tipo de exercício físico contribuiu principalmente para manutenção do número e o aumento da capacidade fagocitária de macrófagos teciduais nos grupos exercitados na intensidade leve, em ratos sedentários. Portanto, esse estudo evidencia o efeito agudo do exercício sobre o sistema imunológico, fato este que fornece respaldo científico para aqueles profissionais envolvidos na atividade física, dentre eles o fisioterapeuta, o professor de educação física e o médico do esporte.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Patrícia Carla Paulino pelo auxílio técnico nos experimentos laboratoriais, além do apoio financeiro de bases de fomento a pesquisa citada anteriormente, sem os quais esta pesquisa não teria sido concluída.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ortega E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev* 2003; 9:70-93.
2. Asgeirsson G, Bellanti, J. Exercise, immunology and infection. *Seminars in Adolescent Medicine* 1987; 3:199-204.
3. Caren LD. Effects of exercise on the human immune system. Does exercise influence susceptibility to infections? *BioScience* 1991; 41:410-414.

4. Fitzgerald L. Exercise and the immune system. *Immunol Today* 1988; 9:337-339.
5. Friman G, Ilbäck NG. Acute infection: Metabolic responses, effects on performance, interaction with exercise, and myocarditis. *Int J Sports Med* 1998;19:S172-S182.
6. König D, Grathwohl D, Weinstock C, Northoff H, Berg A. Upper respiratory tract infection in athletes: influence of lifestyle, type of sport, training effort, and immunostimulant intake. *Exerc Immunol Rev* 2000; 6:102-120.
7. Nash HL. Can exercise make us immune to disease? *The Physician and Sports Med* 1986;14:251-253.
8. Sharp C, Parry-Billings M. Can exercise damage your health? *New Sci* 1992; 33-37.
9. Simon HB. Exercise and human immune function. In: Ader R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press, p. 869-896, 1991.
10. Woods JA, Davis JM, SMITH JA, NIEMAN DC. Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31:57-66.
11. Ortega E, Collazos ME, Barriga C, De la Fuente M. Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *J Appl Physiol Occup Physiol* 1992; 64:323-327.
12. Saxton JM, Claxton D, Winter E, Pockley AG. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci (Lond)* 2003;104:69-77.

13. Ortega E. Influence of exercise on phagocytosis. *Int J Sports Med* 1994; S172-S178.
14. Nieman D, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med* 1999; 27:73-80.
15. Pedersen BK, Bruunsgaard H. How physical exercise influences the establishment of infection. *Sports Med* 1995;19:393-400.
16. Munk A, Guyre PM. Glucocorticoids and immune function. In: Ader R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. New York: Academic Press, 1991, p. 447-474.
17. Weigent DA, Blalock JE. Associations between the neuroendocrine and immune system. *J Leuko Biol* 1995; 57:137-150.
18. Woods JA. Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med* 2000; 21:S24-S30.
19. Carter L, Ferrari JK, Davison JS, Befus D. Inhibition of neutrophil chemotaxis and activation following decentralization of the superior cervical ganglia. *J Leukoc Biol* 1992; 51:597-602.
20. Nagatomi R, Kaifu T, Okutsu M, Zhang X, Kanemi O, Ohmori H. Modulation of the immune system by the autonomic nervous system and its implication in immunological changes after training. *Exerc Immunol Rev* 2000; 6:54-74.
21. Ortega E, Marchena JM, Garcia JJ, Schmidt A, Schulz T, Malpica I et al. Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol. *J Appl Physiol* 2001; 91:1067-1072.

22. Bernton EW, Bryant HU, Holaday JW. Prolactin and immune function. In: Ader R, Felten DL, Cohen N. Psychoneuroimmunology New York: Academic Press, p. 403-428, 1991.
23. Kelly KW. Growth hormone in Immunobiology. In: Ader R, Felten DL, Cohen N. Psychoneuroimmunology. New York: Academic Press, p. 377-402, 1991.
24. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LAS, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 2001; 130:21-27.
25. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. Braz J Med Biol Res 2002; 35:1389-1394.
26. Dornfest BS, Lapin DM, Naughton BA, Adu S, Korn L, Gordon AS. Phenylhydrazine-induced leukocytosis in the rat. J Leuk Biol 1986; 39:37-48.
27. Pithon-Curi TC, Pires de Melo M, De Azevedo R, Zorn TMT, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils. Presence of phosphate-dependent glutaminase. Am J Physiol 1997; 273:C1124-29.
28. Larrabee RC. Leukocytosis after violent exercise. Journal of Medical Research 1902; 7: 76-82.
29. Barriga C, Pedrera MI, Maynar M, Maynar J, Ortega E. Effect of submaximal physical exercise performed by sedentary men and women on some parameters of the immune system. Rev Esp Fisiol 1993; 49:79-86.
30. Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shephard RJ. Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. Int S Sports Med 1998;19:130-143.
31. Mackinnon LT, Tomasi MD. Immunology of exercise. Annals of Sports Medicine 1986; 3:1-4.

32. McCarthy DA, Dale MM. The leucocytosis of exercise. *Sports Med* 1988; 6:333-363.
33. Van Furth R, Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. *J Exp Med* 1986; 163:474-479.
34. Forner MA, Barriga C, Rodriguez AB, Ortega E. A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis. *J Physiol* 1995; 488:789-794.
35. Ortega E, Barriga C, De la Fuente M. Study of the phagocytic process in neutrophils from elite sportswomen. *Eur J Appl Physiol* 1993; 66: 37–42.
36. Ortega E, Marchena JM, García JJ, Barriga C, Rodríguez AB. Norepinephrine as mediator in stimulation of phagocytosis induced by moderate exercise. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93: 714-718.

PERITONEAL MACROPHAGES PHAGOCYtic CAPACITY AFTER SHORT DURATION EXERCISE IN SEDENTARY RATS

Background: Physical therapy is a knowledge area that presents physical exercise as one of the variety therapeutic resources. Long duration and high intensity exercise promote alterations on immune system. However, these effects are less clear in short duration exercise.

Objective: The aim of this study was analyze the effects of short duration swimming exercise in different durations and intensities on total leukocytes, peritoneal macrophages number and phagocytic capacity in sedentary rats.

Method: Wistar rats were used (n=30, n=6 each group), divided in sedentary control group (C); groups exercised for 5 minutes in low or moderate intensity (5L e 5M, respectively); groups exercised for 15 minutes in low or moderate intensity (15L e 15M, respectively). The animals were submitted to physical exercise only one time. Leukocytes total count, circulating monocytes, tissue macrophages number and phagocytic capacity were analyzed. ANOVA and Tukey tests were used with $p < 0.05$.

Results: It was observed increase in total leukocytes in exercised groups; increase in peritoneal macrophages count in animals that performed 15 minutes of moderate exercise and increase in phagocytic capacity for 5 and 15 minutes low intensity groups ($p < 0.05$). Short duration physical exercise performed in low intensity increased phagocytic capacity in tissue macrophages.

Conclusions: These results suggest that short duration exercise promotes increase in phagocytic capacity, this is a very important fact in therapeutic and preventive point of view, referring to intervention in a sedentary population as well as for hose involved in rehabilitation and sport, respectively.

Key words: physical exercise; immune system; macrophages; phagocytic capacity; physical therapy.

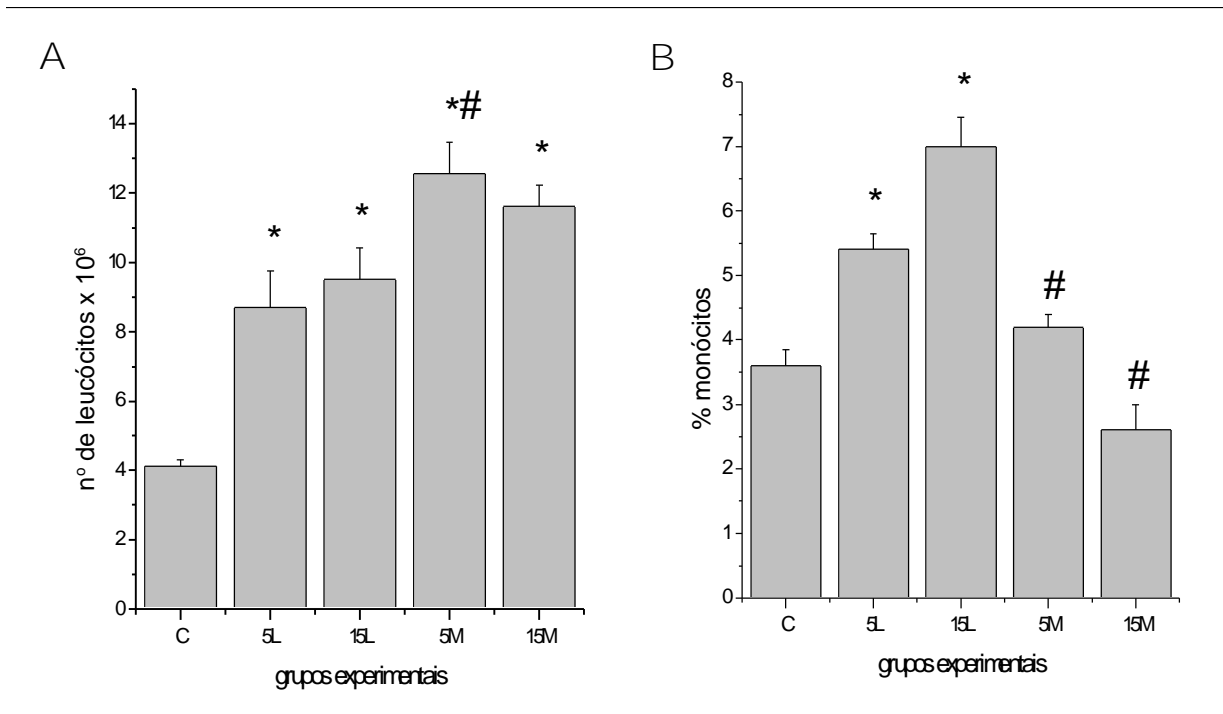


Figura 1

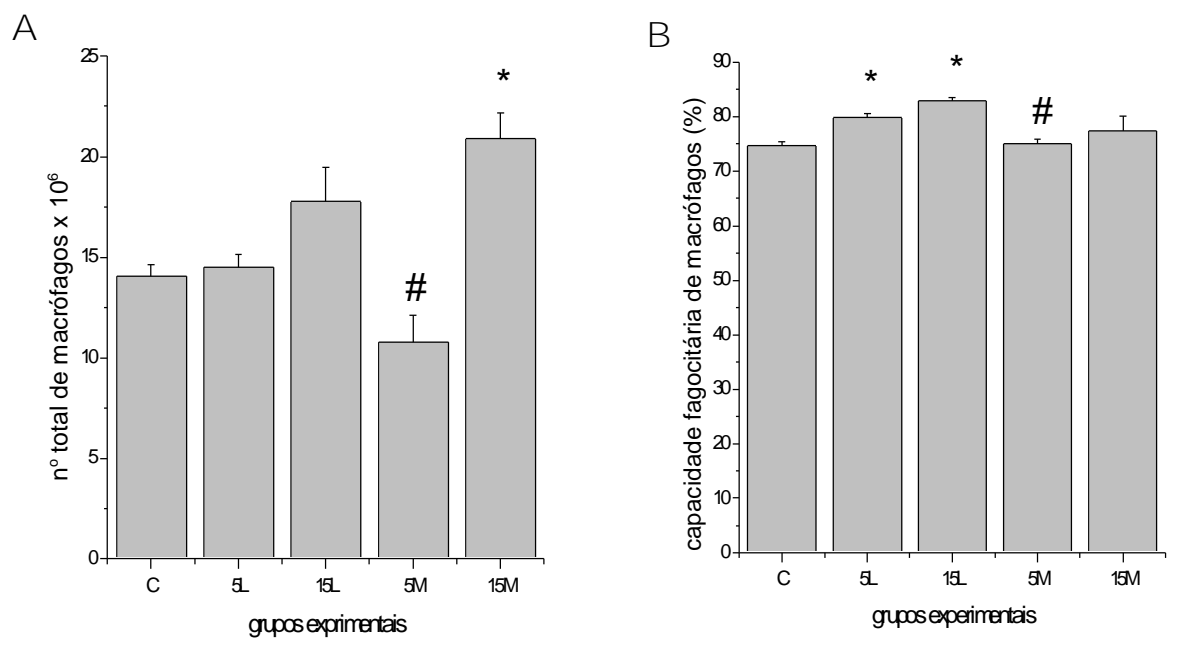


Figura 2

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Leucócitos totais (A) e percentual de monócitos circulantes (B). Os resultados são expressos pela média \pm erro padrão da média. *quando comparado com o grupo controle; # quando feita a comparação entre os grupos da mesma duração, porém com intensidades diferentes. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderado.

Figura 2: Número total de macrófagos peritoneais (A) e Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais (B). Os resultados são expressos pela média do número de leucócitos e percentual de células \pm erro padrão da média. *quando comparado com o grupo controle; # quando feita a comparação entre os grupos da mesma duração, porém com intensidades diferentes. C= controle sedentário; 5L= 5 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 15L = 15 minutos de exercício agudo de intensidade leve; 5M= 5 minutos de exercício agudo de intensidade moderada; 15M= 15 minutos de exercício agudo de intensidade moderado.

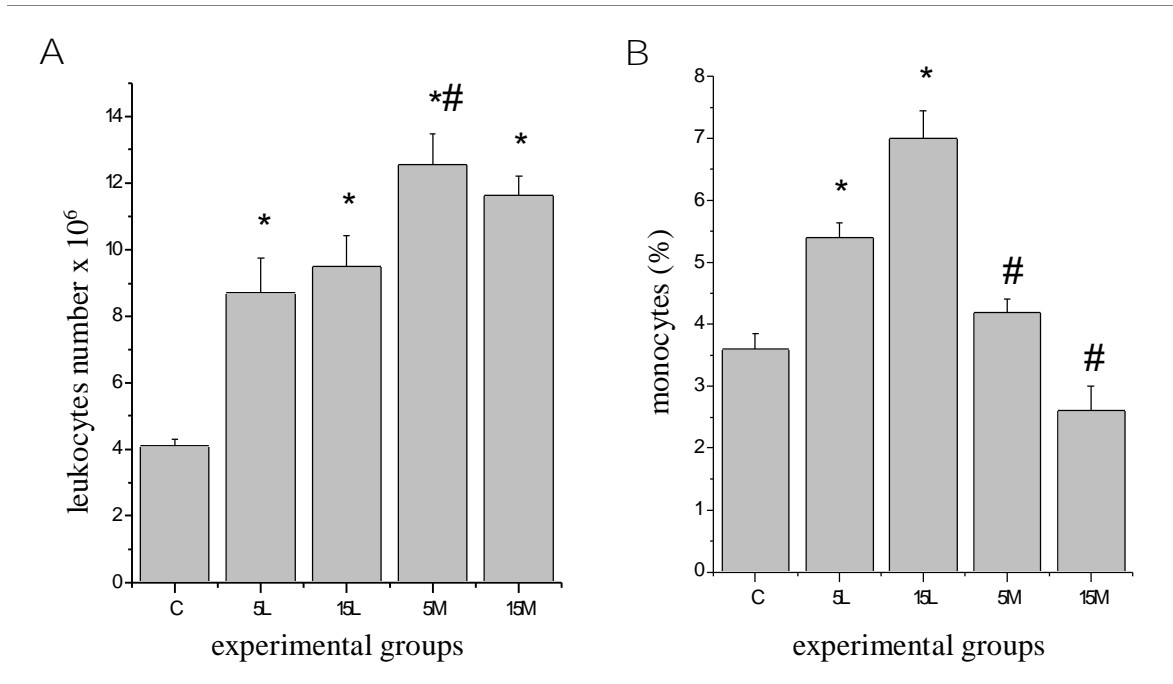


Figure 1

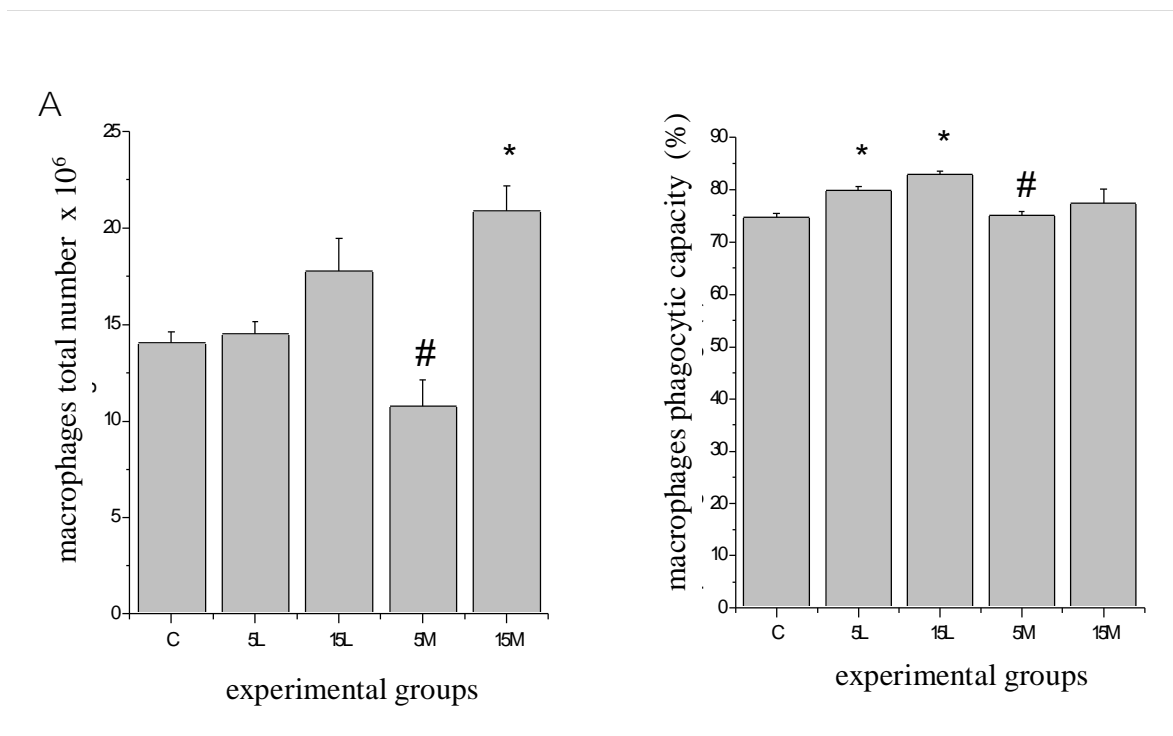


Figure 2

FIGURE LEGEND

Figure 1: Total leukocytes (A) and circulating monocytes percentage (B). The results were expressed by average \pm standard average error. *as compared to control group; # comparison between same duration, but different intensities groups. C= sedentary control; 5L= 5 minutes of acute low intensity exercise; 15L = 15 minutes of acute low intensity exercise; 5M= 5 minutes of acute moderate intensity exercise; 15M= 15 minutes of acute moderate intensity exercise.

Figure 2: Total peritoneal macrophages count (A) and peritoneal macrophages phagocytic capacity (B). The results were expressed by average \pm standard average error. *as compared to control group; # comparison between same duration, but different intensities groups. C= sedentary control; 5L= 5 minutes of acute low intensity exercise; 15L = 15 minutes of acute low intensity exercise; 5M= 5 minutes of acute moderate intensity exercise; 15M= 15 minutes of acute moderate intensity exercise.