Universidade do Porto
Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física

Influência do treino de resistência moderado na resposta imunológica de ratos submetidos à contenção aguda

Carol Virgínia Góis Leandro

Porto, 2005



UNIVERSIDADE DO PORTO

Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física

INFLUÊNCIA DO TREINO DE RESISTÊNCIA MODERADO NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE RATOS SUBMETIDOS A CONTENÇÃO AGUDA

Dissertação apresentada às provas de Doutoramento no ramo das Ciências do Desporto, nos termos do decreto-lei nº 216/92 de 13 de Outubro, orientada pelo Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte, da Universidade do Porto, e co-orientada pela Profª. Doutora Célia Maria Machado Barbosa de Castro, da Universidade Federal de Pernambuco.

Carol Virgínia Góis Leandro

Fevereiro, 2005

FICHA DE CATALOGAÇÃO

Leandro, Carol Virgínia Góis (2005). Influência do Treino de Resistência Moderado na Resposta Imunológica de Ratos Submetidos a Contenção Aguda. Dissertação apresentada às provas de Doutoramento em Ciências do Desporto. Porto: Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Palavras Chave: EXERCÍCIO REGULAR, STRESS, SISTEMA IMUNOLÓGICO, TOLERÂNCIA-CR

Este trabalho, que decorreu no âmbito do projecto **"L-Glutamina e treinamento físico: efeito sobre parâmetros funcionais do sistema imunológico e estruturais do sistema digestivo em ratos submetidos ao stress agudo por contenção"**, foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE).

DEDICATÓRIA

À Édrija Santana e Sandra Farsky

Aos meus amigos Raul, Sandra Lopes e Wylla

Aos meus dois amores Maurício e Talita

Aos meus Pais

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Doutor José Alberto Ramos Duarte que teve toda a paciência, compreensão e maestria na orientação e construção desse trabalho.

À Profa. Doutora Célia Maria Machado Barbosa de Castro, pela confiança e oportunidades concedidas.

Ao Laboratório de Fisiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, na pessoa da Profa. Doutora Tânia Cristina Pithon-Curi e do Prof. Doutor Rui Curi, por toda a colaboração prestada e pelas facilidades concedidas na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Raul Manhães-de-Castro do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, pelo constante incentivo e amizade.

Ao Prof. Doutor António Marques, presidente do Conselho Científico da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Ao Prof. Doutor Jorge Olímpio Bento e ao Prof. Doutor Jorge Mota, da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto, pelo apoio prestado desde o mestrado, particularmente pelas facilidades financeiras e administrativas concedidas, decisivas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor Cristóforo Scavone do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela gentileza de dosar a corticosterona.

Ao Prof. Doutor Ricardo Souza do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

À Prof. Doutora Sandra Farsky do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

À Prof. Doutora Valéria Pereira do Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães de Pernambuco.

Aos colegas Érika Portioli, Sandro Hirabara, Alessandra Folador, Tatiana Alba, Cláudia Lagranha, Adriana Levada e Thais de Lima do Laboratório de Fisiologia Celular do ICB-USP, pela grande ajuda durante os experimentos.

Aos meus queridos companheiros: Elizabeth, Wilma, Rhowena, Rozana, Soninha, Karla Mônica, Matilde, Tereza, Jairza, Lúcia, Rogério, Fátima, Katty, Vaninho, Eduardo, Ricardo Sightman e Mary Zietlow. O que seria de mim sem vocês?

Aos meus queridos companheiros de "Sampa": Karê, Bob, Edgair, Aurélio, Léo (Soléo), Léo, Tatiana, Rose, Carmem (pelas fotos), Camila, Carlos Balbino (pelas aulas sobre inflamação), Fernanda, Rosângela, Ariana, Renata, Lígia Maura, Valéria e a Sra. Geraldina. O que teria sido de mim sem vocês?

Aos Professores e funcionários da Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física da Universidade do Porto.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos Professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco e aos meus colegas de curso.

Aos meus queridos alunos por tudo que eu venho aprendendo com vocês.

ÍNDICE GERAL

Dedicatória

Agradecimentos

Índice

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Resumo

Abstract

Résumè

Lista de Abreviaturas e Símbolos

1. Introdução 1

2. Revisão da literatura

2.1. O sistema imunológico: considerações gerais 5

2.2. Stress: interacções neuroendócrinas e imunológicas 9

2.3 O exercício físico e a resposta imunológica 14

2.4 Treino físico e resposta imunológica 20

3. Objectivos e hipóteses 27

4. Material e métodos 29

5. Resultados 50

6. Discussão

6.1 Considerações gerais sobre o estudo 72

6.2 Considerações sobre o consumo de oxigénio no teste máximo e durante o treino 73

6.3 Efeito do treino físico moderado 76

6.4 Efeito da contenção aguda 84

6.5 Efeito do treino físico moderado em ratos stressados 90

7. Conclusões 97

8. Perspectivas para investigações futuras 98

9. Bibliografia 99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1.	Características dos testes realizados no estudo prévio, para avaliação do VO_{2max} em tapete ergométrico, com base no protocolo sugerido por Brooks e White (1978) e Taylor e Weibel (1981), com inclinações constantes (**A, B, C e D**) ou variáveis entre os estágios (**E**).	32
Figura 4.2.	Desenho experimental da fase de aplicação do programa de treino ou de manipulação dos animais e da sua relação com os momentos de avaliação do consumo máximo de oxigénio. As barras em azul indicam o dia em que os animais eram avaliados. As barras com padrão indicam o dia de repouso, do treino e da manipulação, para os animais treinados e não-treinados, respectivamente.	33
Figura 4.3.	Aparelho utilizado para avaliação do consumo de oxigénio dos ratos.	34
Figura 4.4.	Tapete ergométrico (Millenium - Imbramed).	35
Figura 4.5.	Descrição dos grupos experimentais	39
Figura 4.6.	Material utilizado para induzir contenção dos animais.	39
Figura 4.7.	Câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos.	42
Figura 4.8.	Histogramas ilustrando a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) por células de duas amostras diferentes. Células íntegras não permitem a passagem de iodeto de propídeo pela membrana e, portanto, emitem baixa fluorescência. Células que apresentam membranas rompidas permitirão a entrada do iodeto de propídeo, que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser.	44
Figura 4.9.	Histogramas que mostram a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 515-530 nm (FL1) por células de duas amostras diferentes.	45
Figura 4.10.	Histogramas que mostram a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) por células de duas amostras diferentes.	46
Figura 4.11.	Lâmina com macrófagos que fagocitaram partículas de Zimosan. (A) macrófagos que fagocitaram, (B) macrófagos que não fagocitaram.	49
Figura 5.1A, 5.1B	Valores médios e EPM do consumo de oxigénio a diferentes velocidades e com diferentes graus de inclinação do tapete. **5.1B:** Variação do consumo de oxigénio relativo ao consumo de oxigénio em função da velocidade nos diferentes estágios durante o teste com a inclinação 20° + 25°.	51

Figura 5.2. Valores do VO_{2max} dos animais submetidos ao programa de treino (T) ou não (NT) ao longo de 8 semanas. Os valores são expressos em média ± EPM. *p<0.05 quando o grupo T foi comparado ao NT, e #p<0.05 quando os valores em cada grupo foram comparados ao seu valor inicial. 52

Figura 5.3. Ganho de peso corporal relativo aos valores iniciais de ratos não treinados (NT) e treinados (T) durante as 8 semanas do protocolo experimental. Os valores são expressos em média ± EPM. *p<0.05 na comparação entre os grupos NT e T para cada instante. 53

Figura 5.4. Representação gráfica dos valores médios ± EPM da percentagem de variação do consumo de oxigénio (VO_2) relativa aos valores máximos desse consumo (VO_{2max}) para cada semana, ao longo do protocolo de treino. 55

Figura 5.5. Valores médios ± EPM da actividade da enzima citrato sintetase nos músculos soleus dos animais não-treinados (NT) e treinados (T) no final do protocolo experimental. * p<0.05. 56

Figura 5.6. Níveis plasmáticos de corticosterona dos animais dos diferentes grupos estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs. grupo NT. # p< 0,05 vs. grupo T+S. 57

Figura 5.7. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do sangue. A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT; # p<0,05 vs T+S. 60

Figura 5.8. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do timo: A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT; # p<0,05 vs T+S. 62

Figura 5.9. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos do timo. Valores expressos em média ± EPM. *p< 0,05 vs NT. 63

Figura 5.10. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do baço: A) integridade de 65

membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado.Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT.

Figura 5.11. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos do baço. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p< 0,05 vs T+S 66

Figura 5.12. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos dos linfonodos mesentéricos: A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado.. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT; # p<0,05 vs T+S. 68

Figura 5.13. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos dos linfonodos mesentérico. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p<0,05 vs T+S. 69

Figura 5.14. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação a taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares em resposta ao estímulo com *e. coli.* Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p<0,05 vs T+S. 70

Figura 5.15. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação a taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares em resposta ao estímulo com *zimosan.* Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p<0,05 vs T+S. 71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 4.1.	Descrição do teste usado para avaliação do Consumo Máximo de Oxigénio, em tapete ergométrico, durante o protocolo experimental	33
Tabela 4.2.	Caracterização do protocolo de treino de acordo com a velocidade, a inclinação do tapete e a duração de cada sessão para cada uma das oito semanas de treino.	38
Tabela 5.1.	Contagem total e diferencial (% do total) de leucócitos do sangue periférico nos diferentes grupos estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). *p<0,05 vs NT, # p<0,05 vs T+S.	58
Tabela 5.2.	Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T do timo nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. *p<0,05 vs NT, # p<0,05 vs T+S.	61
Tabela 5.3.	Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T do baço nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p< 0,05 vs T+S.	64
Tabela 5.4.	Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T dos linfonodos mesentéricos nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p< 0,05 vs T+S.	67

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito do treino físico moderado na resposta imunológica de ratos submetidos a uma situação de contenção. Ratos machos Wistar (n=30) foram divididos em não-treinados e treinados. Os animais treinados foram submetidos a um programa de 8 semanas de corrida em tapete ergométrico (5 dias/semana, 60 minutos/dia a 70% do VO_{2max}). Após as 8 semanas e 24 horas após a última sessão de treino, metade dos animais de cada grupo foi submetido, durante 60 minutos, ao stress agudo por contenção. Os animais treinados não apresentaram alteração na contagem de leucócitos da circulação, no arranjo de linfócitos no timo, baço e linfonodos mesentéricos, nos indicadores de apoptose de linfócitos, na função proliferativa de linfócitos e fagocítica de macrófagos alveolares. Houve um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ ($p<0,05$) no sangue e nos linfonodos mesentéricos nos animais treinados. Por outro lado, os animais não-treinados e submetidos à contenção apresentaram uma leucopenia, linfopenia, neutrofilia e monocitose. Houve uma diminuição na relação de linfócitos TCD4+/CD8+ do sangue, diminuição na composição celular do timo, do baço e dos linfonodo. Os resultados revelaram ainda um aumento do número de linfócitos com indicadores de apoptose em órgãos linfóides e no sangue. A função proliferativa de linfócitos do timo e linfonodos e a fagocítica de macrófagos foi diminuída ($p<0.05$) e houve um aumento na resposta proliferativa de linfócitos do baço ($p<0.05$). Os animais treinados e submetidos posteriormente à situação de contenção, não apresentaram as alterações anteriormente relatadas. As evidências disponíveis indicam que o treino moderado tem efeitos moduladores importantes na dinâmica e na função das células imunes quando o organismo é sujeito à acção de estímulos agressores. Estes dados sugerem que o treino físico atenuou a intensidade das respostas orgânicas agudas à situação de contenção, induzindo uma tolerância cruzada ao nível da resposta do sistema imune.

Palavras-Chave: Exercício regular, stress, sistema imunológico, tolerância-cruzada.

ABSTRACT

This study evaluated the effects of moderate physical training on immune response of rats submitted to acute restraint stress. Male Wistar rats (n=30) were randomly assigned to a non-trained and trained groups. Trained animals were submitted to 8 weeks of a treadmill-running program (5 days/week, 60 minutes/day, 70% of VO_{2max}). After 8 weeks of moderate exercise training and 24 hours post exercise, half of the animals in each group were submitted to acute restraint stress during 60 minutes. The trained animals did not show any alteration in the numbers of circulating leukocytes, in lymphocytes of thymus, spleen, and mesenteric lymph nodes, in the indicators of apoptosis of lymphocytes, in the proliferative response of lymphocytes, and in the phagocytic function of alveolar macrophages. There was an increase in the percentage of lymphocytes TCD4+ ($p<0,05$) in the blood and lymph nodes of trained animals. On the other side, non-trained animals and submitted to restraint showed a leukopenia, lymphopenia, neutrophilia, and monocytose. There was a reduction in the lymphocyte TCD4+/CD8+ ratio of blood, in the cellular composition of thymus, spleen, and lymph nodes. Furthermore, the results also showed an increase in the percentage of apoptotic lymphocytes in the blood, thymus, spleen, and lymph nodes. The proliferative response of thymocytes and lymphocytes of lymph nodes was reduced ($p<0,05$), as well as the phagocitic activity of macrophages, concomitantly with an increase of proliferative response of lymphocytes of the spleen ($p<0.05$). The trained animals submitted to the acute restraint stress did not showed any alteration when compared to the non-trained restraint stressed animals.

The evidences available suggest that moderate physical training modulates important aspects of dynamic and function of immune cells when the organism is submitted to restraint stress. These data strongly support the concept of physical training-induced tolerance (cross-tolerance) in the immune response to an aggressive stressor.

Key-words: Regular exercise, stress, immune system, cross-tolerance

RÉSUMÉ

Cette étude a évalué les effets de l'entraînement physique modéré sur la réponse immunne de rats, soumis ou pas au stress de contention. Des rats Wistar mâles (n=30) ont été distribués randomiquement en groupes d'entraînés ou de pas-entraînés. Les animaux entraînés ont été soumis à un programme de course pendant 8 semaines, à tapis roulant (5 jours/semaine, 60 minutes/jour, à 70% du VO_2max). Après 24 heures de la dernière session d' entraînement, la moitié des animaux dans chaque groupe a été soumise au stress de contention aigu pendant 60 minutes. Les animaux entraînées n'ont présenté aucune modification dans le nombre de leucocytes sériques, lymphocytes du thymus, de la rate et lymphonodes mésentériques, indicateurs d'apoptose de lymphocytes, réponse proliferative des lymphocytes, ou dans la fonction de phagocytose des macrophages alvéolaires. Il y a eu une augmentation dans le pourcentage de lymphocytes TCD4+ ($p < 0,05$) dans le sang et dans les lymphonodes mésentériques chez les animaux entraînés. Parcontre, les animaux pas-entraînés qui ont été soumis à la contention ont développé leucopénie, lymphopénie, neutrophilie, et monocytose. Il y a eu une réduction dans la proportion des lymphocytes TCD4+/CD8+ du sang, et dans la composition cellulaire du thymus, rate, et lymphonodes. En outre, nos résultats ont montré une augmentation dans le pourcentage des lymphocytes avec l'indication d'apoptose dans le sang, thymus, rate, et lymphonodes. La réponse proliférative des thymocytes et lymphocytes dans les lymphonodes a été réduite ($p < 0,05$), ainsi comme l'activité phagocytique des macrophages. Cependant, il y a eu une augmentation de la réponse proliférative des lymphocytes de la rate ($p < 0.05$). Les animaux entraînés et soumis à un stress de contention aigu n'ont présenté aucune altération par rapport aux animaux pas-entraînés et stressés. Les résultats de ce travail suggèrent fortement que l'entraînement physique induit une tolérance-croisée dans la réponse immunnitaire. Toutefois, l'entraînement physique atténue significativement l'intensité des réponses organiques aiguës au stress de contention.

Mots-clef: régulier exercíses, stressés, système immunnitaire, tolérance-croisée

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Ac	Anticorpo
ACTH	Hormona Adrenocorticotrófica
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMPc	Monofosfato de Adenosina Cíclico
ANOVA	Análise de Variância
Apaf-1	Factor de activação de apoptose 1
Bcl-2	B-cell leukemia cell line
BHA	Antioxidante Hidroxianisol Butilato
CAT	Catalase
CD	Cluster of Differentiation
CD4+CD8+	Linfócitos Imaturos Duplamente Marcados
CGB	Globulina Ligante de Glucocorticóide
Cm	Centímetro
ConA	Concanavalina A
CRH	Hormona Libertadora da Corticotrofina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTNB	Distrobrevina Beta
E. Coli	*Escherichia Coli*
EPM	Erro Padrão da Média
ERN	Espécies Reactivas de Nitrogénio
ERO	Espécies Reactivas de Oxigénio
Fas	Proteína transmembrana de superfície celular
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	Forward scattered
g	Grama
g	Gravidade
GH	Hormona do Crescimento
GPX	Glutationa Peroxidase
GR	Receptores de Glucocorticóides
h	Hora
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPA	Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HSP	Proteína de Choque Térmico
HSR	Resposta ao choque Térmico
i.p.	intraperitoneal
ICAM	Molécula de Adesão Intracelular
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
IRTS	Infecções do Tracto Respiratório Superior
km	Quilômetro
Km/h	Quilômetro por hora
L/min	Litros por minuto

LBA	Lavado Broncoalveolar
Lc	Leucócitos
IK-Bα.	IK associada à Proteína Kinase
LPS	Lipopolissacarídeos
m/min	Metros por minuto
mA	Mili-ampère
mg	Miligrama
mg/mL	Miligramas por mililitro
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm^2	Milímetro quadrado
mm^3	Milímetro cúbico
Mn-SOD	Manganês Superoxido Desmutase
NF-KB	Activador Transcripcional Nuclear
ng/ml	Nanograma por mililitro
NK	Natural Killer
nm	nanômetro
NT	Não-treinado
NT+S	Não-treinado e stressado
PBS	Tampão Fosfato
PI	Iodeto de Propídeo
POMC	Pró-opiomielanocortina
RIE	Radioimunoensaio
RM	Repetição Máxima
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RU-486	Antagonista do Receptor Tipo II de Glucocorticóide
s	Segundo
SAG	Síndrome da Adaptação Geral
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SOD	Superóxido Desmutase
SSC	Side scattered
T	Treinado
T+S	Treinado e stressado
Th1	Linfócitos T helper do tipo I
Th2	Linfócitos T helper do tipo II
TNF-α	Factor de Necrose Tumoral Alfa
TSH	Hormona Estimuladora da Tiróide
VCO_2	Volume de Dióxido de Carbono
VO_2	Volume de Oxigénio
VO_{2max}	Consumo Máximo de Oxigénio
μg	Micrograma
μL	Microlitro

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O "estado de stress" diz respeito à condição de alteração da homeostase do organismo em resposta a estímulos percebidos, sejam eles de natureza física, química ou psicológica, e motiva o aparecimento de inúmeras alterações orgânicas, não só fisiológicas mas também comportamentais (Selye, 1955). O estímulo cognitivo é detectado por um dos cinco sentidos, os quais enviam informações para o cérebro, particularmente para o hipotálamo (Selye, 1955). Várias substâncias, que funcionam como sinais fundamentais, são, então, libertadas do hipotálamo e uma cascata de eventos se sucede, sendo a hipófise o principal alvo dessas substâncias. Na sequência, as hormonas hipofisárias actuarão na tireóide, nas gónadas, nas glândulas supra-renais e em órgãos linfóides (Selye, 1971). Em resposta, os órgãos linfóides libertarão células imunes para a circulação (Selye, 1955). Tudo indica que o sistema imunológico seja um alvo, altamente sensível, dos mediadores libertados não só pela hipófise e restantes componentes do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, mas também por outras glândulas endócrinas (Ottaviani e Franceschi, 1996). De facto, as células imunocompetentes parecem possuir a capacidade para produzir e secretar alguns deles (Gaillard et al, 1994). De forma idêntica ao que acontece em células da pituitária, a produção destas hormonas por células do sistema imune responde, na maioria dos casos, a factores inibitórios ou estimuladores do hipotálamo, bem como, a hormonas envolvidas na regulação do feedback negativo (Gaillard et al, 1994).

Esta modulação do sistema imunológico, induzida pelo stress agudo, já é um fenómeno bem conhecido (Concordet e Ferry, 1993; Millán et al, 1996; De Castro et al, 1999), estando descrita a ocorrência de neutrofilia, linfopenia e monocitose a seguir à exposição ao estímulo indutor da situação de stress (Ottaway e Husband, 1994). Estas alterações parecem resultar da migração de células para o sangue, via aumento da concentração das catecolaminas (Ottaway e Husband, 1994). Selye (1955) observou que o timo, o baço, os nódulos linfáticos

e outras estruturas linfóides apresentavam intensa redução ou atrofia no animal stressado. Em adição, a exposição ao frio ou a contenção física induzem uma involução tímica em ratos com consequentes alterações na composição celular deste órgão (Selye, 1936b). Apesar de não-conclusivos, os estudos sugerem uma alta correlação dos efeitos imunossupressores induzidos pela situação de stress e o aumento nos níveis de glucocorticóides no plasma (Gillis et al, 1979; Gaillard, 1994; Raberg et al, 1998). Desse ponto de vista, a função das células imunes também parece ser afectada após um estímulo stressante, uma vez que há receptores para glucocorticóides nestas células (Gaillard, 1994). Particularmente a actividade citotóxica de células natural killer (NK) e a proliferativa de linfócitos T e B parecem ser afectadas (Herbert e Cohen, 1993). A função anti-microbiana e antitumoral de macrófagos/monócitos parecem também diminuir (Di Rosa et al, 1990). A diminuição destas funções tem sido associada a uma maior incidência de infecções e ao alastramento de tumores em animais submetidos a condições de stress prolongado.

A relação entre exercício físico e saúde vem-se consolidando nos últimos anos. Estudos clínicos, de ampla abordagem epidemiológica, têm demonstrado a alta incidência de mortalidade por doenças cardiovasculares em pessoas sedentárias (Farrell et al, 1998). Por outro lado, a práctica regular de exercício físico tem sido associada à promoção da saúde e à prevenção de numerosas doenças crónico-degenerativas (Farrell et al, 1998). Para além disso, têm também surgido na literatura diversos trabalhos relacionando os efeitos do exercício físico com a funcionalidade do sistema imunológico (Nieman et. al. 1990a; Nieman et. al. 1990b; Fitzgerald 1991; Heath et. al. 1991; Blanning et al 1998). Diferentes tipos de exercício físico parecem provocar alterações distintas no sistema imune (Tvede et al, 1993). Estudos recentes indicam que o exercício regular moderado pode melhorar os mecanismos orgânicos de defesa, enquanto que o treino intenso parece enfraquecê-los (Nehlsen-Cannarella, 1998; Pyne & Gleeson, 1998; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Esta relação, entre exercício físico e sistema imune, é complexa e pode ser vista como uma subclasse de uma área científica

maior que é a "imunologia do stress" (Hoffman-Goetz e Pedersen 1994). Neste sentido, ressalta-se a comunicação bidireccional entre o sistema nervoso, o sistema endócrino e o sistema imunológico, sugerindo vias autonómicas e modulação da resposta imune após uma exposição ao stress (Blalock, 1994; Besedovski et al, 1985).

O exercício físico, enquanto modelo indutor de stress físico, pode actuar em qualquer instância ao longo da sequência de eventos da resposta imune (Brenner et al, 1998). Contudo, se esta actuação é benéfica ou deletéria poderá depender quer da intensidade quer da frequência e duração do esforço. Particularmente, o exercício físico moderado e efectuado de forma regular parece estar associado a uma melhoria de muitas funções imunes, parecendo retardar ou até mesmo prevenir a incidência e a progressão de alguns tumores (Smith et al, 1996). Há também relatos de uma baixa incidência de infecções do tracto respiratório superior em indivíduos que se exercitavam regularmente (Heath et al, 1991). Estudos realizados com humanos e animais, sugerem que o aumento de funcionalidade do sistema imunológico motivado por um treino moderado, parece resultar do aumento (i) da actividade anti-tumoral e citotóxica de macrófagos e de linfócitos, (ii) da actividade antimicrobiana e fagocítica de neutrófilos, e (iii) da actividade citotóxica de células NK, (Lin et al, 1993; Woods e Davis, 1994; Woods et al, 1997; Bacurau et al, 2000). Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda permanecem desconhecidos, mas podem estar associados ao aumento da tolerância de células imunes quando expostas a pequenas cargas de stress.

Em muitos órgãos (por exemplo, o coração) e tecidos tem-se demonstrado que a resposta a situações agressivas parece ser atenuada pelo treino físico aplicado previamente, isto é, parece que o treino induz o aparecimento de tolerância para outros situações agressivas/stressantes de natureza diferente da do exercício físico agudo, tais como a isquemia/reperfusão e a agressão química, sendo este fenómeno conhecido por tolerância cruzada (Kihlstrom et al, 1990, Ji et al, 1994, Liu et al, 2000).

Os estudos no campo da imunologia do exercício descrevem o efeito de cargas súbitas de exercício físico a seguir ao treinamento, associando modelos de stress agudo com o crónico (Baum et al, 1994; Nieman et al, 1995; Bury et al, 1998; Mackinnon, 2000; Mooren et al, 2002; Hayes et al, 2003). Apesar destes modelos fornecerem dados esclarecedores da resposta imune ao exercício, parecem limitar a extrapolação dos resultados para outros tipos de stress.

O stress de contenção, enquanto modelo de stress de origem psicológica, desencadeia alterações imunes e um padrão de secreção hormonal similares aos demais tipos de estímulos indutores de stress estudados (Manhães-de-Castro, 1995). Assim, do ponto de vista imunológico, a exposição de um animal à situação de contenção pode inibir muitos aspectos da defesa orgânica, incluindo actividade das células NK, a função de macrófagos, a resposta dos linfócitos T e a produção de anticorpos por linfócitos B, entre outros (Fleshner et al, 1992; Millan et al, 1996). Estas respostas, tal como já referido, podem ser explicadas, pelo menos parcialmente, por factores e mecanismos neuro-endócrinos (Gaillard, 1994). Assim sendo, a utilização de um modelo de stress psicológico, como a contenção, poderia esclarecer ou suscitar novos questionamentos a respeito do impacto que o exercício físico regular pode exercer no sistema imune e no estudo da tolerância cruzada induzida pelo treinamento.

Tendo em consideração o anteriormente exposto, este estudo teve como objectivo verificar o efeito do treino físico moderado na intensidade e na qualidade da resposta imunológica aguda ao stress psicológico de contenção. Para tanto, em ratos treinados e sedentários, submetidos ou não ao stress de contenção, foram analisados os seguintes parâmetros imunes: (1) contagem total e diferencial de leucócitos e de linfócitos do sangue (2) sub-populações de linfócitos em órgãos linfóides (timo, baço e linfonodos mesentéricos); (3) indicadores de apoptose de linfócitos do sangue, timo, baço e linfonodos mesentéricos; (4) índice de proliferação de linfócitos e (5) taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O sistema imunológico: considerações gerais

O sistema imunológico é determinante para o combate a microorganismos invasores, para a remoção de células mortas e detritos celulares e para o estabelecimento da memória imunológica (Schulenburg et al, 2004). Como qualquer sistema, possui uma organização complexa e um conjunto invariante de relações entre os seus componentes (Schulenburg et al, 2004). Também como qualquer sistema, ele opera num meio com o qual interage. Esse meio é o organismo como um todo, do qual ele é um componente.

As células que constituem o sistema imunológico originam-se a partir de células hematopoiéticas pluripotentes, localizadas na medula óssea, e as diferenciações posteriores ocorrem não só aí como também noutros locais específico do organismo (Hames e Glover, 1996). As populações leucocitárias compreendem os granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), os monócitos/macrófagos e os linfócitos (linfócitos T, B e células "natural killer" [NK]).

Os neutrófilos compreendem a sub-população de leucócitos de maior número na circulação (Schulenburg et al, 2004). São importantes fagócitos do sangue e participam na reacção inflamatória, sendo sensíveis a agentes quimiotáxicos libertados pelos mastócitos e basófilos assim como pela activação do sistema do complemento (Mabbott, 2004). A leucocitose por neutrofilia pode indicar uma infecção bacteriana ou uma inflamação em resposta a uma lesão tecidual (Schulenburg et al, 2004).

Uma outra linhagem de células fagocíticas inclui os mononucleados monócitos e macrófagos. Os monócitos são células presentes no sangue periférico que continuamente se diferenciam em macrófagos após migrarem para os tecidos (Adams e Hamilton, 1992). Os macrófagos estão presentes em vários tecidos, órgãos e cavidades (Adams e Hamilton, 1992). Estão envolvidos

na actividade microbicida e antitumoral e manifestam uma função celular acessória como apresentadores de antigénio (Adams e Hamilton, 1992). Aspectos característicos dos macrófagos incluem a capacidade de aderência, a quimiotaxia, a produção de espécies reactivas de oxigénio e a citotoxicidade (Adams e Hamilton, 1992). São também uma fonte de citocinas mediadoras das reacções fisiopatológicas que habitualmente acompanham a lesão celular (Boscolo et al 2004).

Os macrófagos são células de alto poder fagocitário, reguladas por outras células (linfócitos T e B) e por mediadores químicos produzidos pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) [Adams e Hamilton, 1992]. Por exemplo, Zwilling et al (1991) verificaram que a activação do eixo HPA suprime a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II) em macrófagos peritoniais de murinos. Da mesma forma, a presença de glucocorticóides em culturas de macrófagos resulta na inibição da produção de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN) por estas células (Di Rosa et al, 1990). Os macrófagos também possuem efeitos pró e anti-inflamatórios e promovem o desenvolvimento da imunidade mediada por linfócitos (Adams e Hamilton, 1992).

Os linfócitos são heterogéneos em tamanho e morfologia (Hames e Glover, 1996). As diferenças entre estas células são observadas quanto à razão núcleo/citoplasma e à presença ou não de grânulos citoplasmáticos (Hames e Glover, 1996). Células de morfologia similar são encontradas no baço, medula óssea, linfonodos, timo, e outras áreas como as placas de Peyer (Bode et al, 1997). Os linfócitos podem ser classificados de acordo com seus marcadores de membrana, reacções a estímulos, padrões de migração e vida-média (Hames e Glover, 1996). No timo, ao adquirirem determinadas características, transformam-se em linfócitos T, com marcadores antigénicos de superfície CD4+ (auxiliar- "helper") ou CD8+ (supressor e citotóxico) [Westermann e Pabst, 1996]. Estas células fazem parte da resposta imunológica celular e proliferam activamente quando estimuladas pela interleucina-2 (IL-2) ou concanavalina A (ConA) [Westermann e Pabst, 1996],

conforme sugerido pela incorporação aumentada de [^{3}H] timidina (Tharp e Preuss,1991).

Apesar de não sintetizarem imunoglobulinas (Ig), os linfócitos T actuam como moduladores da resposta imunológica (Hames e Glover, 1996). Isto se dá através de interacções entre os vários tipos de linfócitos T com os macrófagos e as células dendríticas durante a resposta imunológica mediada por células (Adams e Hamilton, 1992). Os linfócitos B atingem a maturidade provavelmente na medula óssea e são precursores das células produtoras de anticorpos, os plasmócitos (Hames e Glover, 1996). Quando estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) em cultura, estas células passam a proliferar (DeFranco et al, 1994).

Os linfócitos normalmente presentes na circulação e nos tecidos linfóides encontram-se em estado quiescente, situação na qual se apresentam metabolicamente pouco activos (Hames e Glover, 1996). Um estímulo do tipo invasivo ou neoplásico é capaz de promover a activação dessas células, levando-as a proliferar e a secretar citocinas envolvidas na resposta imune (Adams e Hamilton, 1992). A mudança para o estado activado é também acompanhada por alterações metabólicas nestas células, onde as vias biossintéticas e energéticas são estimuladas (Calder e Yaqoob, 1999, Nascimento et al, 2001).

Há ainda as células NK, um tipo de linfócito encontrado no sangue. Estas células são conhecidas por desencadearem a defesa precoce contra certas infecções intracelulares e exterminação de células tumorais (Adams e Hamilton, 1992).

A resposta local a uma infecção ou tecido lesionado envolve a produção de citocinas, que vão facilitar o influxo dos vários tipos de leucócitos para a região atingida (Adams e Hamilton, 1992). Para além da sua acção mediadora no sistema imune, as citocinas podem também actuar em outros sistemas modificando, nestes, as suas funções (Vizi et al, 1998). Por exemplo, Gulick et al (1989) verificaram que a interleucina (IL-1) e o factor de necrose tumoral alfa (TNF-α) suprimem a taxa de contracção espontânea e reduzem a actividade contráctil em resposta a estimulação β-adrenérgica de cardiomiócitos. Já

Dinarello (1994) verificou que a injecção sistémica de IL-1 parece aumentar a excreção renal de sódio. No que respeita ao sistema nervoso central, o TNF-α inibe a libertação da noradrenalina na eminência mediana (Elenkov et al, 1992) e a IL-2 reduz a acção da acetilcolina no hipocampo (Hanisch et al, 1993).

O sistema imune parece ser sensível tanto aos agentes infecciosos como às alterações na homeostasia orgânica (Besedovsky et al, 1985). As alterações na homeostasia sugerem uma inter-relação do sistema imune com outros sistemas, como o nervoso e o endócrino (Blalock, 1994). Aliás, a relação bidireccional entre estes sistemas parece ser o marco do entendimento actual da actividade imunológica, demonstrando a forma multi-conectada com que o sistema imune actua (Atanackovic et al, 2004). É de ressalvar os experimentos pioneiros onde se demonstrou, em camundongos, que a resposta imune ao vírus da doença de Newcastle era acompanhada por um aumento no sangue da hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e de corticosterona (Besedovsky et al,1985). Algum produto libertado por leucócitos parecia induzir a secreção das referidas hormonas. Em seguida, foi observado que o efeito era neutralizado por anticorpos anti-IL-1 (Besedovsky et al, 1986). Aliás, a injecção de IL-1 em camundongos aumentava a concentração de ACTH e dos glucocorticóides no sangue (Besedovsky et al, 1986). Em 1990, Bermudez et al verificaram a presença de receptores β-adrenérgicos em macrófagos peritoniais de ratos e em células linfóides. Vizi et al (1998) evidenciaram a presença de fibras nervosas simpáticas inervando órgãos linfóides. Actualmente, as doenças auto-imunes e alguns tipos de neoplasias já não são mais vistas de forma isolada mas sim interligadas ou até mesmo dependentes de alterações neuroendócrinas (Atanackovic et al, 2004; Faure et al, 2004).

Há muito tempo que se sabe da estreita relação entre o estado emocional de um indivíduo e sua susceptibilidade a doenças, porém, somente em épocas mais recentes se começou a estudar, de maneira sistemática, como se processa essa inter-relação (Ottaviani e Franceschi, 1996). Neste contexto, surgiu, então, um novo ramo da ciência, denominado neuroendocrinoimunologia, o qual estuda toda a via de neuromodulação, desde os impulsos provenientes do córtex cerebral, activando o sistema nervoso

simpático ou passando pelo eixo hipotalâmico-hipofisário, seus produtos endócrinos e as consequências fisiológicas envolvidas com o sistema imune (Gaillard, 1994).

2.2. Stress: interacções neuroendócrinas e imunológicas

O estado de stress refere-se à condição de alteração da homeostasia do organismo em resposta a estímulos percebidos (físicos, químicos, psicológicos ou outros) [Selye, 1955], motivando respostas fisiológicas e comportamentais (Selye, 1955, 1956).

A resposta ao stress e a resposta imune são fenómenos fundamentais na luta do organismo contra agentes potencialmente danosos (Berczi, 1998). Estas respostas, essenciais para a sobrevivência, parecem ter bases sólidas e substratos comuns quer em seres simples, como um molusco, quer em seres complexos, como o homem (Ottaviani e Franceschi, 1996). Por exemplo, a hormona libertadora da corticotrofina (CRH) e o ACTH, que possuem função clara na mediação da resposta ao stress, estão presentes em moluscos, peixes e humanos (Ottaviani et al, 1995; Ottaviani e Franceschi, 1996). Os hemócitos, células imunes de invertebrados, produzem uma variedade de citocinas, hormonas, neuropeptídeos e neurotransmissores, constituindo uma espécie de resposta primitiva ao stress (Ottaviani e Franceschi, 1996). Da mesma forma, em células imunes fagocíticas de vertebrados e invertebrados, a presença de citocinas, óxido nítrico, pró-opiomielanocortina (POMC) e seus derivados peptídicos, revelam uma possível origem filogenética comum do sistema imune e neuroendócrino (Ottaviani e Franceschi, 1997).

O stress tem dois lados inter-relacionados: o estímulo e a resposta (Selye, 1936a). Diante disso, Selye (1936b) criou um neologismo e introduziu a palavra "stressor" para significar o agente causal, mantendo o termo "stress" para a condição resultante. A totalidade destas alterações seria a "síndrome da adaptação geral" ou SAG (Selye, 1971). De acordo com este autor, a SAG evolui em três estágios: a reacção de alarme, o estágio de resistência e finalmente o estágio de exaustão. A reacção de alarme é uma fase aguda,

onde o organismo desencadeia manifestações metabólicas e funcionais de ajuda. Contudo, se o stressor se mantém, o organismo entra então na fase de resistência que conduz à regressão de várias alterações da primeira fase. O estágio de exaustão é a consequência da falha dos mecanismos de adaptação.

É no sistema límbico que tem início a função psíquica de avaliação da situação, dos factos e eventos externos, promovendo as interacções das percepções córtico-cerebrais com o hipotálamo (Gaillard, 1994). Imediatamente em resposta a um stressor, ocorre um aumento da secreção endócrina de catecolaminas por activação do SNS (Gaillard, 1994). Há também um aumento das concentrações de dopamina e noradrenalina no cérebro, o que leva o hipotálamo a aumentar a libertação de CRH na circulação portal (Gaillard, 1994). Em resposta, a hipófise aumenta então a secreção da ACTH, vasopressina, prolactina, hormona do crescimento (GH) e hormona estimuladora da tiróide (TSH) [Gaillard, 1994]. Na sequência, as hormonas hipofisárias actuarão na tiróide, nas gónadas, nos órgãos linfóides e nas glândulas supra-renais (Gaillard, 1994). Estas últimas vão secretar hormonas como as catecolaminas e os corticóides que são os principais indicadores biológicos da resposta ao stress (Herbert e Cohen, 1993; Gaillard, 1994). Por este tipo de resposta hormonal ser aparentemente padronizado e independentemente do tipo de agente stressor, as hormonas que revelam elevações dos seus níveis plasmáticos, tais como as catecolaminas, os corticoides, a hormona de crescimento e o glucagon, são habitualmente referenciados na literatura como "hormonas de stress" (Gaillard, 1994).

A activação do SNS e os eventos sequenciais do eixo HPA parecem possuir uma relação intrínseca com as componentes do sistema imunológico, não só pela presença de receptores hormonais em leucócitos, mas também pela relação anatómica observada entre os três sistemas (Herbert e Cohen, 1993; Gaillard, 1994). Um exemplo desta inter-relação seria a activação do eixo HPA pela IL-1 que vai resultar no aumento da secreção de CRH (Dinarello, 1994). Da mesma forma, os leucócitos humanos, durante a produção de

interferon-γ (IFN-γ), expressam peptídeos com particularidades antigénicas, características biológicas e estruturais similares ao ACTH (Blatteis, 1992).

A modulação do sistema imunológico induzida por um stressor já é um fenómeno bem conhecido (Concordet e Ferry, 1997; Millán et al, 1996; De Castro et al, 1999). A seguir à exposição ao stress, ocorre uma neutrofilia, linfopenia e monocitose (Ottaway e Husband, 1994). O recrutamento destas células para o compartimento vascular em resposta ao stressor parece ser mediado pela adrenalina, e em menor grau pela noradrenalina (Landmman et al, 1984). Millán et al (1996) verificaram alterações na dinâmica de leucócitos do sangue em ratos após 1 hora de contenção. A expressão de β-receptores nas diferentes células imunes parece fornecer a base molecular para acção das catecolaminas (Millán et al, 1996). Contudo, a densidade de receptores adrenérgicos e a eficiência do sistema de transdução AMPc diferem nos vários tipos de células imunocompetentes (Gaillard, 1994). Os neutrófilos e as células NK parecem apresentar maior número de receptores, sendo seguidos, por ordem decrescente, pelos linfócitos TCD8+, pelos linfócitos B e, finalmente, pelos linfócitos TCD4+ (Gaillard, 1994).

Um stressor pode induzir a inibição de muitos aspectos da defesa orgânica, incluindo a actividade das células NK, a resposta proliferativa dos linfócitos e a produção de anticorpos pelos plasmócitos (Bauer et al, 2001). Estas alterações têm repercussões nos mecanismos de defesa do organismo e comprometem a sua actuação contra agentes infecciosos e oncogénicos, assim como nos processos alérgicos e na auto-imunidade (Bauer et al, 2001; Atanackovic, 2004). Gillis et al (1979) observaram uma inibição na produção do factor de crescimento de linfócitos T induzida pelo aumento de hormonas do stress. De Castro et al (2000) verificaram uma diminuição na produção do anião superóxido por macrófagos em resposta ao stress psicológico em ratos. Estes estudos suportam o conceito de imunossupressão induzida pelo stress, pois, conforme referido acima, os linfócitos e os macrófagos actuam, de forma determinante, contra a carcinogénese e a auto-imunidade.

A dinâmica e as funções de células imunes periféricas também são transitoriamente alteradas pelos glucocorticóides (Bauer et al, 2001). Os glucocorticóides constituem uma classe de hormonas esteróides, que apresentam actividade na homeostasia, no desenvolvimento, na diferenciação e na resposta ao stress, fazendo conexão directa entre sinais extracelulares e a resposta transcripcional (Fleshner et al, 1992). Em níveis fisiológicos, estas hormonas bloqueiam o processo inflamatório, suprimem a activação do sistema imune e actuam como agentes inibidores do crescimento de células imunes, *in vitro* e *in vivo* (Ambrose et al, 1970; Cupps et al, 1985; Wu et al, 1991 e Jefferies, 1994). São comummente utilizadas na terapia aguda e crónica de diversas doenças imunes, como a asma e a artrite reumatóide, na quimioterapia de neoplasmas linfóides, por causarem apoptose nessas células, e, ainda, como imunosupressores, na prevenção da rejeição celular/tecidual após transplante de órgãos (Jefferies, 1994; Strasser, 1995). Jefferies (1991) ressalta a importância das doses fisiológicas de glucocorticóides em pacientes e animais experimentais, melhorando a síntese de imunoglobulinas por linfócitos B *in vitro*. Também a resposta de linfócitos T periféricos de ratos adrenalectomizados à ConA foi reduzida em 65%, quando comparada aos linfócitos de ratos controle, sendo completamente restaurada pela administração de corticosterona (Wiegers et al, 1993). Assim, em doses fisiológicas, os glucocorticóides parecem ter um papel importante na restauração da homeostasia orgânica.

Níveis aumentados desta hormona influenciam essencialmente a quimiotaxia de granulócitos, linfócitos e monócitos e a função de macrófagos e linfócitos T (Jefferies, 1991; Wiegers et al, 1993). Os glucocorticóides diminuem rapidamente os níveis sanguíneos de linfócitos (mais os T do que os B, e mais os TCD4+ do que os TCD8+ e as células NK), eosinófilos, basófilos e monócitos, mas aumentam os níveis de neutrófilos no sangue (Jefferies, 1991). Esta redistribuição de células deve-se, provavelmente, às alterações na expressão de moléculas de adesão induzida pelos glucocorticóides e parece ser temporariamente benéfica, tendo em vista a diminuição da intensidade das

reacções inflamatórias aos agentes stressores (Jefferies, 1991; van de Stolpe et al, 1993).

Os glucocorticóides, em altas concentrações, parecem induzir baixa na regulação de receptores de linfócitos T e aumentar a taxa de catabolismo, reduzindo as reservas de aminoácidos que são necessários para proliferação de linfócitos B e síntese de imunoglobulina (Nascimento et al, 2001). Há também atrofia do timo e em menor extensão outros tecidos linfóides (Jefferies, 1991). Em ratos, os glucocorticóides levam a uma dramática depleção de linfócitos T do timo, afectando subpopulações CD4+CD8+ (linfócitos imaturos duplamente marcados) e a percentagem de CD4+ e CD8+ (Bauer et al, 2001). O mecanismo subjacente ainda não está bem esclarecido, mas pode estar associados à indução de apoptose de linfócitos T, imaturos e maduros, neste órgão (Engler e Stefanski, 2003).

A apoptose, que pode ser disparada sob diversos tratamentos celulares com activação de múltiplas vias de transdução de sinal, é caracterizada por uma combinação de eventos (Wyllie et al, 1980). O processo geralmente se inicia por activação de um receptor específico, o qual, por sua vez, activa uma cascata de caspases, as quais coordenam e exercem acções efectoras, como hidrólise de proteínas e DNA, externalização de fosfatidilserina e alteração do citoesqueleto, entre outros (Wyllie et al, 1980). Um dos meios mais utilizados para se averiguar se ocorre morte celular por apoptose é pela manutenção da integridade dos organelos, principalmente das mitocôndrias, e visualização da fragmentação do DNA (Kroemer et al, 1998). Niess et al (1997) verificaram em ratos que um exercício físico exaustivo provocou stress oxidativo e lesão do DNA de leucócitos. Hoffman-Goetz e Zajchowski (1999) demonstraram que o aumento nos níveis de corticosterona em resposta a um stressor físico é suficiente para induzir a apoptose de linfócitos. Concordet e Ferry (1997) verificaram que um exercício intenso de longa duração (2.5 horas) promoveu a apoptose de timócitos em ratos. O processo de morte celular destas células foi parcialmente inibido pelo tratamento prévio com RU-486 (um antagonista do receptor tipo II de glucocorticóide), indicando o envolvimento de uma via mediada pelo receptor de glucocorticóides (Concordet e Ferry, 1997).

Pelo exposto, tudo indica que as células do sistema imunológico se encontram sob uma complexa rede de influência dos sistemas nervoso e endócrino. Seus mediadores (neurotransmissores e hormonas diversas) actuam sinergicamente com outros produtos linfocitários, de macrófagos e moléculas da resposta inflamatória na regulação de suas acções (Berczi, 1998).

A ideia de uma relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino progrediu com os estudos sobre a resposta imunológica a diferentes agentes stressores (Keast et al, 1988; Nieman et al, 1990a; Nieman et al, 1990b; Brenner et al, 1998; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Por exemplo, o exercício físico, enquanto modelo mensurável de indução de stress físico, provoca alterações na dinâmica e na funcionalidade de células imunes similares aos demais tipos de stressores (revisto por Leandro et al, 2002).

Um estudo pioneiro nessa área foi realizado por Larrabee (para refs. ver Nieman et al, 1990b), o qual verificou uma leucocitose em corredores a seguir a uma maratona, decorrente, sobretudo, do aumento do número de neutrófilos na circulação. Contudo, a relação entre exercício físico e o sistema imune tornou-se mais sólida a partir de observações acerca do aumento da incidência de infecções do tracto respiratório superior (IRTS) em atletas após treinos intensos ou prolongados, e/ou competições exaustivas (Peters e Bateman, 1983; Nieman et al, 1990a, Heath et al, 1991; Mackinon e Hooper, 1994; Pyne e Gleeson, 1998).

Os efeitos do exercício físico sobre as componentes do sistema imune são empiricamente conhecidos, apesar de só recentemente estarem a ser estudados os mecanismos subjacentes a estas influências.

2.3. O exercício físico e a resposta imunológica

O exercício físico pode actuar, em qualquer instância, ao longo da sequência de eventos da resposta imune (Brenner et al, 1998). Tendo em consideração que diferentes tipos e cargas de exercício físico podem ter repercussões distintas no sistema imunológico (Keast et al, 1988), é importante salientar que o exercício moderado (até 70% do VO_{2max}) e o exercício intenso

(acima de 75% do VO_{2max}) influenciam de forma diferente os parâmetros da imunidade tanto celular como humoral (Brenner et al, 1999).

De forma geral, o exercício físico agudo provoca um aumento na concentração de neutrófilos e de células NK na circulação (Kendall et al, 1990). Tvede et al (1993) estudaram a resposta da dinâmica de células sanguíneas em ciclistas dinamarqueses submetidos a 1 hora de exercício físico, em três diferentes intensidades de esforço (25, 50 e 75% do $VO_{2máx}$). Neste estudo, a linfocitose (imediatamente após o exercício) e posterior linfopenia (2 horas após o final do exercício) foram observadas em resposta ao exercício tanto a 50% como a 75% do $VO_{2máx}$ (Tvede et al, 1993). Estas alterações parecem resultar da migração de células de órgãos linfóides para o sangue ou como parte da resposta inflamatória às lesões no tecido muscular (Brenner et al, 1998). Níveis sanguíneos aumentados de catecolaminas, em resposta ao exercício, também influenciam a redistribuição destas células (Hellstrand et al, 1985). Kappel et al (1991) observaram em humanos que a infusão intravenosa de doses de adrenalina idênticas aquelas observadas durante um exercício intenso (75% do VO_{2max}, 1h), alterou as subpopulações de leucócitos e a actividade de células NK. Aliás, a concentração sanguínea das catecolaminas aumenta linearmente com a duração do exercício e exponencialmente com a intensidade do mesmo (Hellstrand et al, 1985).

O exercício físico agudo moderado parece também influenciar a função dos neutrófilos (Keast et al, 1988). Muitos pesquisadores verificaram que o exercício moderado modifica a quimiotaxia, a desgranulação e a actividade oxidativa dos neutrófilos após 1 hora de esforço a 60% $VO_{2máx}$ (Ortega et al, 1993; Smith et al, 1990, Smith et al, 1996, Pyne et al 2000). O aumento na actividade oxidativa de neutrófilos foi descrito, tanto em atletas quanto em sujeitos não-treinados, após 1 hora de exercício aeróbio a 60% do $VO_{2máx}$ (Smith et al, 1990). Muns et al (1994) verificaram um aumento da actividade fagocítica dos neutrófilos, em homens treinados, 24 horas após uma corrida de 20 km, a 60% do $VO_{2máx}$. Contrariamente, o exercício intenso e de longa duração parece diminuir a capacidade oxidativa destas células (Pyne et al, 2000). Smith et al (1990) verificaram uma diminuição, temporária, na

capacidade oxidativa de neutrófilos durante uma carga aguda de exercício intenso (>85% do $VO_{2máx}$) e no período de recuperação. Pedersen e Bruunsgaard (1997) relatam que a imunossupressão observada é apenas evidente quando o exercício físico é intenso e de longa duração (60 minutos ou mais). Robson et al (1999) compararam o efeito de um exercício a 80% $VO_{2máx}$ (durante 1 hora) com um exercício a 55% do $VO_{2máx}$ (durante 3 horas) em indivíduos activos. Estes autores verificaram, contudo, que durante e após esforço houve um aumento similar na contagem e na função de neutrófilos nas duas intensidades. Estas alterações funcionais, em reposta a diferentes cargas de exercício físico, podem ser clinicamente significativas, reflectindo estados de stress ou imunossupressão associados ao exercício.

O stress provocado pelo exercício físico parece ter um efeito estimulador na função de macrófagos (Woods et al, 1999). Tanto o exercício moderado como o intenso podem aumentar várias funções destas células incluindo a quimiotaxia, a capacidade de aderência, a produção de espécies reactivas de oxigénio, a taxa de metabolismo do nitrogénio, a actividade citotóxica e a capacidade fagocítica (Field et al, 1991; Woods et al, 1993; Ortega et al, 1999). Em animais, Woods et al (1994) observaram que tanto uma corrida exaustiva num tapete (18-35 m/min, 5° de inclinação, durante 2-4 horas) quanto uma moderada (18 m/min, 5° de inclinação, durante 30 minutos) podem provocar um aumento da citotoxicidade anti-tumoral de macrófagos peritoniais. Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda permanecem desconhecidos, mas podem estar associados a factores neuroendócrinos (Woods et al, 1999). Ademais, ainda são necessários estudos que investiguem a significância fisiológica das alterações funcionais destas células.

O aumento da concentração sanguínea de linfócitos durante o exercício agudo parece constituir uma resposta altamente estereotipada (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Dentro das populações de linfócitos, as células NK parecem ser as mais responsivas imediatamente após uma carga súbita de exercício físico (Grenn et al, 2002). Exercícios de vários tipos, duração e intensidade induzem o recrutamento de células NK para o sangue, assim como provocam alterações na actividade citolítica destas células (Ceddia et al, 1999).

Em humanos, 1 ou 2 horas após esforço intenso de longa duração (>75% durante 1 hora), a concentração de células NK e a actividade citolítica diminuem em cerca de 25 – 40% do nível basal (Pedersen et al, 1989, Klokker et al, 1995). Esta redução pode prolongar-se por até 2 – 4 horas após o exercício físico (Pedersen et al, 1989, Pedersen e Bruunsggaard, 1995). Um estudo demonstrou que o exercício exaustivo de força (séries de 10 repetições, a 65% de 1-RM, até a fadiga) em atletas treinados, também provoca uma diminuição na função citolítica das células NK no período de recuperação (2 horas pós-esforço) [Nieman et al, 1995b]. Da mesma forma, alguns pesquisadores observaram uma diminuição da actividade citolítica destas células em atletas remadores submetidos a um esforço muito intenso de curta duração (6 minutos) [Nielsen et al, 1996].

O exercício moderado (65% - 70% do $VO_{2máx}$) parece não alterar a concentração de linfócitos TCD4+ e TCD8+ do sangue (Tvede et al, 1993; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Um estudo não verificou modificação na percentagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+ em 18 adultos jovens sedentários submetidos a cinco cargas repetidas de exercício físico em cicloergómetro [Hoffman-Goetz, 1990]. Contudo, alguns estudos têm observado que um exercício físico a 85% do $VO_{2máx}$ tende a provocar uma diminuição na concentração de linfócitos TCD4+, sem alterar a concentração de linfócitos TCD8+ do sangue (Ceddia et al, 1999, Pedersen e Hoffman-Goetz et al, 2000). Dessa forma, a proporção de CD4+/CD8+ diminui, reflectindo um maior aumento de linfócitos TCD8+ (Ceddia et al, 1999), o qual pode estar associado a uma situação de imunossupressão (Fry et al, 1992; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

Em humanos, a resposta proliferativa de linfócitos T, em resposta a um exercício físico a 50% e 75% do $VO_{2máx}$ (durante 1 hora), parece diminuir no período de recuperação (Tvede et al, 1989; Tvede et al, 1993). Contudo, durante e após esforço máximo (90% VO_{2max}) de curta duração (6 minutos) não ocorreu qualquer alteração na resposta proliferativa de linfócitos (Nielsen et al, 1996). Da mesma forma, também não foram encontradas alterações na

proliferação de linfócitos após exercício físico de resistência de força (Nieman et al,1995b).

A resposta de linfócitos B também parece ser alterada pelo exercício físico (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000) apesar de alguns estudos relatarem a não ocorrência de alterações na concentração salivar de IgA e de IgE no soro, durante um exercício moderado (Nieman et al, 1990a; Nieman et al, 1990b; Mackinon et al, 1994; Nehlsen-Canarella, 1998). Contudo, Blannin et al (1998) encontraram baixas concentrações de IgA após uma corrida de 31 Km a 65% do $VO_{2máx}$. Outros estudos encontraram uma diminuição na concentração de IgA, tanto na saliva quanto na mucosa nasal, após um exercício físico intenso de longa duração (Nieman et al, 1990a; Mackinon et al, 1994; Nehlsen-canarella, 1998). Dessa forma, os pesquisadores estão a associar a coincidência desta redução com o aumento da prevalência de ITRS em atletas (Nieman et al, 1990a; Nieman et al, 1995a). Um outro estudo verificou que os sintomas de ITRS ocorridos em maratonistas têm uma prevalência de 33.3%, enquanto a prevalência num grupo controle atinge apenas os 15.3% (Peters e Bateman, 1983). Embora os estudos revelem um aumento dos sintomas de ITRS após um exercício intenso e de longa duração, não existem informações se esses sintomas são decorrentes do processo infeccioso em si, ou se são devidos a uma inflamação local ou sistémica causada pelo exercício (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

Assim, de acordo com o acima exposto, durante e após uma carga súbita de exercício físico ocorrem alterações na concentração sanguínea e na funcionalidade de células do sistema imune. Todavia, essas alterações não devem ser vistas isoladamente, mas como parte de uma complexa rede bidirecional de sistemas interligados (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Neste sentido, os neurotransmissores e as hormonas circulantes parecem desempenhar um importante papel na mediação das alterações imunes induzidas pelo exercício agudo (Ortega et al, 1999). Em níveis alterados, estes mediadores podem afectar a imunidade, promovendo efeitos variados na regulação da resposta deste sistema (Brenner et al, 1998).

Em resposta tanto a um exercício físico prolongado e intenso (90 minutos a 75% do VO_{2max}) quanto a um exercício de curta duração e muito intenso (20 minutos a 85% do VO_{2max}) pode ocorrer um aumento das concentrações de β-endorfinas na circulação (Angelopoulos, 2001). Em ratos, as β-endorfinas parecem inibir a proliferação de linfócitos e podem estar envolvidas no aumento da quimiotaxia e da fagocitose de macrófagos peritoniais (Van Den Bergh et al, 1993; Ortega et al, 1996). Da mesma forma, parecem aumentar a actividade citolítica de células NK durante o stress crónico, mas não o recrutamento destas células para circulação (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). A administração de naloxano (antogonista opióide), em mulheres submetidas a teste máximo em cicloergômetro, bloqueou o aumento na actividade citolítica de células NK, embora o número destas células não tivesse diferido do grupo placebo (Fiatarone et al, 1988).

Alguns estudos relatam ainda que o exercício físico intenso de longa duração parece induzir a apoptose de linfócitos decorrente do aumento dos níveis de cortisol (Mars et al, 1998). Hoffman-Goetz e Zajchowski (1999) demonstraram que linfócitos T de camundongos, incubados com concentrações de corticosterona (250-450 ng/ml), aumentam os níveis dos marcadores de apoptose. Em humanos, Tvede et al (1994) verificaram uma resposta mitogênica reduzida de linfócitos T em resposta a um exercício agudo intenso (85% do VO_{2max}). Portanto, os efeitos do aumento da concentração de β-endorfinas e de cortisol, durante o esforço, podem estar relacionados à imunossupressão evidenciada após exercícios físicos intensos e de longa duração ou após treinos exaustivos.

Muitas áreas da imunologia do exercício ainda não estão totalmente elucidadas, incluindo o padrão da resposta imunológica ao exercício em outros tecidos que não o sangue e a integração entre o músculo esquelético e as células imunes. Da mesma forma, não está ainda compreendido se as alterações neuroendócrinas são transitórias após frequentes séries de exercício físico agudo, ou se reflectem adaptações hormonais persistentes que também estão presentes durante o repouso.

2.4. Treino físico e a resposta imunológica

Diante de evidências sobre o efeito benéfico do exercício físico moderado, vários estudos tem-se voltado para o efeito do treino físico moderado no sistema imunológico. O treino físico moderado parece estar associado a uma melhoria de muitas funções imunes, podendo retardar ou até mesmo prevenir a incidência, a progressão ou o alastramento de tumores em animais (Peters et al, 1995; Davis et al, 1998; Bacurau et al, 2000). Por exemplo, Pedersen et. al. (1989), ao avaliarem o efeito do exercício crónico sobre alguns parâmetros imunológicos de ciclistas treinados por 4 anos consecutivos, detectaram uma diminuição na incidência de infecções com um consequente aumento da funcionalidade imunológica.

Intervenções transversais e longitudinais têm sido utilizadas no estudo da resposta imune ao exercício crónico (Mackinnon, 2000). Em estudos transversais, os parâmetros imunes (incidência de IRTS, contagem de células e funcionalidade) são comparados aos valores dos sedentários ou a referências clínicas (Nieman et al, 1995a), assumindo que qualquer alteração que ocorra poderá estar associada ao treino. No entanto, sabe-se hoje que existe uma grande variabilidade individual, a qual não pode ser resolvida com uma simples avaliação, num momento particular, de um só parâmetro (Mackinnon, 2000). Nos estudos longitudinais, os parâmetros imunes podem ser avaliados nos mesmos indivíduos, testando a influência de diferentes factores associados aos programas de treino (moderado vs intenso, intenso vs período de competição) [Macknnon e Hopper, 1994]. Comparativamente aos modelos transversais, este modelo longitudinal fornece informações mais interessantes sobre os efeitos do volume de treino e/ou intensidade do mesmo (Mackinnon, 2000).

Por outro lado, é difícil controlar outras variáveis intervenientes como a dieta, o período de competição, as viagens e o stress psicológico (Mackinnon, 2000), as quais podem, de forma independente, influenciar a funcionalidade do sistema imune. Por exemplo, Peters et al (1993) reportaram uma menor incidência de ITRS em corredores suplementados com 600mg de vitamina C três dias antes da corrida, comparativamente aos seus pares. Também Lindsay

et al (1997) verificaram que a adição de ácido gordo ômega 3 na dieta, independente do exercício físico moderado, pode fornecer efeitos benéficos na função imune (aumento da actividade das células NK). Da mesma forma, Nieman et al (1990b), num estudo com maratonistas, relataram que 12% dos participantes tiveram 1,2 vezes mais ocorrências de ITRS uma semana após a prova quando esta era realizada nos meses de inverno. Neste mesmo estudo, foi observada uma maior incidência de IRTS nos participantes no período que antecedia a prova quando comparados aos seus pares não participantes (Nieman et al, 1990b).

Nos estudos com animais, os resultados ainda são divergentes. Uma das razões pode ser atribuída à variabilidade dos protocolos de treino utilizados (Mackinnon, 2000). Grande parte das pesquisas têm utilizado protocolos de treino baseados nos valores do consumo máximo de oxigénio (VO_{2max}), na velocidade máxima atingida pelos animais em testes máximos de corrida, ou ainda nos níveis sanguíneos de lactato (Lin et al, 1993; Gobatto et al, 2001; Bacurau et al, 2000). Os protocolos de exercício físico com base no VO_{2max} limitam a comparação directa entre os estudos, pois o VO_{2max} varia de acordo com as características individuais (sexo, idade, peso corporal), com as diferentes espécies em estudo, com o desenho experimental e com a linhagem dos animais (Pasquis et al, 1970; Taylor e Weibel, 1981; Seeherman et al, 1981; Sabapathy et al, 2004).

Em contraste com o grande número de estudos que relacionam a resposta imune ao exercício físico agudo, pouco ainda é conhecido sobre o efeito crónico do treino físico no sistema imunológico. Existe uma percepção geral que os atletas de alto nível têm um maior risco de adquirir infecções, como a ITRS durante períodos de treino intenso e após competições exaustivas (Nieman et al, 1990b, Nieman, 2000). Por outro lado, atletas não competitivos ou indivíduos que aderem a um prática regular de exercício leve ou moderado, comparativamente à população sedentária, parecem apresentar uma maior protecção contra estas infecções (Nieman et al, 1995a; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000).

A alta incidência de ITRS entre atletas despertou o interesse científico sobre a imunossupressão observada em resposta ao treino intenso (Pyne e Gleeson, 1998). Os níveis basais de IgA salivar diminuíram em homens submetidos a 10 semanas de treino intenso em tapete ergométrico (McDowell et al, 1992). Bury et al (1998) verificaram uma diminuição na resposta proliferativa de linfócitos T e na função fagocítica de neutrófilos em futebolistas no período de competição. A susceptibilidade às infecções pós-treino destes atletas pode ser, em parte, atribuída à função comprometida de células imunes. De facto, a explicação mais simplificada para a imunossupressão, em resposta a uma carga intensa de exercício físico, é a de que existe um desgaste aumentado das funções orgânicas com exagerada produção de espécies reactivas de oxigénio e incremento do stress oxidativo ao nível tecidual (Nieman, 2000). De facto, Lin et al (1999) verificaram um aumento da apoptose de timócitos associado ao aumento da produção de ERO em ratos submetidos a dois dias de exercício físico intenso, tendo estes efeitos sido atenuados com a administração prévia do antioxidante hidroxianisol butilato (BHA).

Trabalhos recentes têm demonstrado que, em oposição ao treino intenso, o treino moderado parece melhorar numerosos parâmetros indicadores de aptidão física e de saúde. Por exemplo, Pastva et al (2004) demonstraram que um treino de intensidade moderada diminuiu a infiltração de leucócitos, a produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão e a remodulação estrutural nos pulmões de camundongos asmáticos. O mecanismo subjacente parece estar associado à modulação do factor de transcripção NF-KB e à fosforilação do IK-Bα. A função de neutrófilos e o índice de proliferação de linfócitos B não se alteraram em estudos realizados com humanos treinados (Nehlsen-Cannarella, 1998). Também Nieman et al (1990b) demonstraram os efeitos do exercício moderado no aumento da resistência a infecções, verificando que mulheres que treinaram 45 minutos de caminhada cinco vezes por semana, no período de 15 semanas, tiveram uma menor incidência de dias relatados com IRTS. A actividade citotóxica de células NK também parece aumentar em atletas não-competitivos após um período de treino de 8 meses (Gedge e Mackinnon, 1998). Em corredores treinados, Baum et al (1994) não

encontraram alteração na contagem diferencial de leucócitos na circulação 22 horas a seguir a última sessão de treino moderado. Todavia, estes autores observaram um aumento na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1) de leucócitos, que pode ser considerado um indicador da protecção contra infecções (Baum et al, 1994). As células do sistema imune parecem apresentar mecanismos adaptativos que permitem a melhoria da sua funcionalidade em resposta ao exercício físico regular e de intensidade moderada (Gedge e Mackinnon, 1998).

Em animais, alguns estudos observaram um aumento na função de macrófagos após um programa de treino moderado. Por exemplo, Woods et al (1994) verificaram um aumento na função fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos após 12 semanas de natação. Bacurau et al (2000) verificaram que os macrófagos de animais treinados e com tumor de Walker-256 apresentaram um aumento na actividade fagocítica e uma maior produção de peróxido de hidrogénio. Foi também verificado um aumento no índice de proliferação de linfócitos e no tempo de vida dos animais treinados com tumor quando comparado aos seus pares sedentários com tumor (Bacurau et al, 2000).

Recentes estudos têm relacionado o efeito do treino moderado e do exercício agudo sobre o sistema imune (Mackinnon, 2000; Mooren et al, 2002; Hayes et al, 2003). Os animais são submetidos ao treino moderado e a seguir a cargas súbitas de exercício físico intenso, associando modelos de stress agudo com o crónico. Lin et al (1993) verificaram que a diminuição na percentagem das subpopulações de linfócitos T, reposta mitogênica de linfócitos B do baço e níveis sanguíneos de IL-2 após uma carga aguda de exercício físico intenso foi atenuada em animais previamente submetidos a 10 semanas de corrida moderada (70% do VO_{2max}). Fu et al (2003) verificaram que o treino moderado (durante 4 semanas) preveniu a diminuição de linfócitos TCD4+, mas estimulou o aumento de linfócitos TCD25+CD8+ avaliados 24 horas após uma carga súbita de exercício físico extenuante. Os resultados indicam que a imunossupressão induzida pelo exercício físico intenso parece diminuir em animais treinados. Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda

permanecem desconhecidos, mas podem estar associados ao aumento da tolerância de células imunes quando expostas a situações indutoras de stress.

Os animais, assim como as plantas, fazem uso de vias comuns e componentes na relação resposta/stress (Pastori e Foyer, 2002). Este fenómeno, que é conhecido como tolerância cruzada vai permitir que seres vivos se adaptem a uma grande amplitude de diferentes estímulos indutores de stress após a exposição a um único agente de stress (Foyer et al, 1997).

Diferentes células em situações de stress podem sobreviver e adaptar-se, na dependência do tipo celular, intensidade do stress e de outros factores (Foyer et al, 1997; Woods et al, 2000). A exposição prévia das células a agentes de stress parece suscitar a resposta ao choque térmico (*Heat Shok Response* HSR), com o aumento da síntese de proteínas do choque térmico (*Heat Shok Protein* HSP) (Peetermans, 1995). Acredita-se que uma nova exposição destas células ao stress poderá produzir menores alterações homeostáticas e, consequentemente, menores lesões (Foyer et al, 1997). Naito et al (2000) verificaram que a atrofia do músculo soleus pelo desuso foi atenuada em animais expostos previamente ao stress térmico (temperatura ambiente 41°C, 60 min). As HSP72 parecem ter tido uma acção na prevenção da degradação de proteínas musculares durante os períodos de actividade contráctil reduzida (Naito et al, 2000). Em cardiomiócitos de ratos (Lee et al, 1995) e de coelhos (Currie et al, 1993), a hipertermia induziu um aumento no nível de HSP, conferindo protecção uma vez que estes animais, quando comparados ao controle, sofreram menor lesão miocárdica em resposta a episódio subsequente de isquemia-reperfusão. Em leucócitos, Fehrenbach et al (2000) observaram um aumento na percentagem de linfócitos, monócitos e granulócitos expressando HSP27, HSP60 e HSP90 citoplasmática imediatamente após uma meia maratona. As células que sintetizam as HSP parecem estar protegidas contra novas exposições, o que se reflecte em menores lesões no organismo ou em partes dele (Lee et al, 1995).

Em muitos órgãos (por exemplo, o coração) e tecidos tem-se demonstrado que as alterações homeostáticas em resposta a situações agressivas parecem ser atenuadas pela aplicação de um treino físico prévio,

fenómeno habitualmente conhecido por tolerância cruzada (revisto por Ascensão et al, 2003). O treino de resistência parece induzir aumentos na actividade de enzimas anti-oxidantes como a glutationa peroxidase (GPX), glutationa redutase, catalase (CAT) e a superóxido desmutase (SOD) assim como diminuição nos níveis de peroxidação lipídica, determinados pela concentração de malonilaldeído tecidual e mitocondrial (Venditti e Meo, 1996). Estas enzimas têm papel fundamental na funcionalidade mitocondrial de corações sujeitos ao stress oxidativo (Lee et al, 1995). A intensidade do treino de resistência e a duração das sessões influenciam a capacidade de adaptação do sistema antioxidante. De facto, Powers et al (1993) verificaram que a combinação de diferentes intensidades (baixa, moderada e elevada) e durações diárias (30, 60 e 90 minutos/dia) de treino promoveu efeitos diferenciados na regulação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX no ventrículo esquerdo.

Em humanos, o treino físico pode estar associado a importantes alterações na imunorregulação induzida pelos glucocorticóides (Hoffman-Goetz e Zajkowski, 1999). Em particular, tem sido visto que o exercício crónico parece associado a um aumento das concentrações plasmáticas de glucocorticóides e a uma reduzida sensibilidade dos linfócitos do sangue periférico para estas hormonas *in vitro* (Nehlsen-Cannarella, 1998; Hoffman-Goetz e Zajkowski, 1999). Estes dados sugerem que o exercício pode alterar a resposta de linfócitos à sinalização dos esteróides.

Desta forma, e uma vez que as células do sistema imune, quando sujeitas a um estímulo de natureza crónica, parecem sensíveis a um conjunto de adaptações, o papel do treino físico moderado e regular no eventual aumento da tolerância de células imunes ao stress parecem ser de interesse. A utilização de um modelo de stress psicológico, como a contenção, poderia esclarecer ou suscitar novos questionamentos a respeito do impacto que o exercício físico regular pode exercer no sistema imune e no estudo da tolerância cruzada induzida pelo treino.

OBJECTIVOS E HIPÓTESES

3. OBJECTIVOS E HIPÓTESES

3.1. Objectivo geral

O presente estudo teve como objectivo geral avaliar o efeito do treino físico moderado na resposta imunológica de ratos submetidos a uma situação de contenção. Para esse fim, foram avaliados, em ratos treinados e sedentários, submetidos ou não ao stress de contenção, os seguintes parâmetros: (1) contagem total e diferencial de leucócitos e de linfócitos do sangue (2) sub-populações de linfócitos em órgãos linfóides (timo, baço e linfonodos mesentéricos); (3) indicadores de apoptose de linfócitos do sangue, timo, baço e linfonodos mesentéricos; (4) índice de proliferação de linfócitos e (5) taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares.

3.2. Objectivos específicos

Aquele objectivo geral foi suportado pelos seguintes objectivos específicos:

(1) Avaliar as variações do consumo de oxigénio durante as corridas do programa de treino assim como as alterações do consumo máximo de oxigénio induzidas pelo protocolo de treino físico ao longo de cada semana do protocolo experimental;

(2) Quantificar, em situação basal, as alterações na actividade da enzima citrato sintetase do músculo soleus no final do programa de treino físico já que estas reflectem a influência desse programa no metabolismo oxidativo dos músculos esqueléticos recrutados;

(3) Avaliar a influência do treino prévio nos níveis plasmáticos de corticosterona, enquanto indicador da intensidade da resposta do animal à situação de contenção;

(4) Averiguar sobre a influência do treino prévio na contagem total e diferencial de leucócitos e de linfócitos do sangue, em animais sujeitos ao stress de contenção;

(5) Avaliar as alterações ocorridas nas sub-populações de linfócitos em órgãos linfóides (timo, baço e linfonodos mesentéricos) induzidas pelo treino prévio e pela contenção aguda;

(6) Estudar a influência do treino físico nas variações dos indicadores de apoptose de linfócitos do sangue, timo, baço e linfonodos mesentéricos, motivadas pela contenção aguda;

(7) Averiguar sobre a influência do treino prévio nas alterações do índice de proliferação de linfócitos do timo, baço e linfonodos mesentéricos, motivadas pela contenção aguda;

(8) Avaliar as alterações da taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares motivadas pela contenção aguda e averiguar sobre a influência do treino prévio na amplitude dessas alterações.

3.3. Hipóteses de trabalho

São defendidas as seguintes hipóteses de trabalho:

(1) - O treino físico moderado, por si só, não induz alterações basais (crónicas) nos parâmetros imunes avaliados.

(2) - A exposição à situação de contenção induz uma resposta aguda neuro-endócrica com implicações na contagem e na função de células imunes em diferentes locais do organismo.

(3) – Comparativamente aos sedentários, nos animais sujeitos a treino físico moderado, a amplitude da resposta neuro-endócrina aguda à situação de contenção é mais atenuada, afectando apenas minimamente os parâmetros imunológicos avaliados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostra

Foram utilizados 30 ratos albinos, machos, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) da colónia do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas I da Universidade de São Paulo/Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas colectivas (máximo 5 animais por gaiola) e receberam dieta balanceada (52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos - Nuvilab CR1-Nuvital®) e água *ad libitum*. Manteve-se um ciclo de claro/escuro invertido de 12/12 horas (escuro – 6h às 18h; claro – 18h às 6h) e temperatura ambiente em torno de 22ºC.

No início do protocolo experimental, todos os animais realizaram um teste de esforço máximo com o objectivo de avaliar o seu consumo máximo de oxigénio ($VO2_{max}$). O protocolo utilizado para a avaliação do $VO2_{max}$ foi baseado nos resultados de um estudo prévio (ver adiante), efectuado com animais com as mesmas características daqueles agora utilizados neste trabalho. A realização do teste máximo inicial permitiu não só definir a intensidade do programa de treino a aplicar como, também, serviu de referência para as diversas provas de esforço máximo que foram efectuadas, no final de cada semana do protocolo experimental, possibilitando, entre outros, um controlo mais efectivo das repercussões funcionais e metabólicas gerais do programa de treino.

Após a realização deste teste máximo inicial, os animais, com um peso corporal compreendido entre as 210 g e as 226 g, foram divididos, de forma aleatória (tendo em consideração a grande homogeneidade observada no seu comportamento motor durante o teste máximo inicial), em dois grupos: grupo não-treinado (*n=15*) e grupo treinado (*n=15*). O peso corporal dos animais foi registado (balança electrónica digital – Marte, modelo S-4000, com sensibilidade de 0,1g) semanalmente ao longo do experimento, no mesmo horário do dia. Os animais não treinados foram manipulados diariamente para controlo da manipulação

recebida pelos animais treinados. A manipulação, os testes de esforço e o protocolo de treinamento foram sempre conduzidos pelo mesmo investigador.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2. Estudo prévio e protocolo de esforço máximo

É de esperar que um protocolo de esforço máximo, desenvolvido para uma determinada estirpe de ratos, possa não ser suficientemente adaptado para outra estirpe, uma vez que numerosos factores podem condicionar o atingimento do VO_{2max}, tais como as características do animal (sexo, idade, peso corporal), o desenho do protocolo utilizado e a própria linhagem dos animais (Pasquis et al, 1970; Taylor e Weibel, 1981; Seeherman et al, 1981; Sabapathy et al, 2004).

Estudos efectuados por outros autores utilizaram protocolos de teste máximo para fêmeas Wistar (Brooks e White, 1978), para as linhagens de rato Wistar-Kyoto, Sprague-Dawley, Okamoto-Aoki (Bedford et al, 1979) e para diferentes outras espécies de mamíferos (Taylor e Weibel, 1981). Tendo por base os protocolos de corrida referidos, foi realizado um estudo prévio, utilizando 20 animais com características semelhantes aos que foram utilizados neste protocolo experimental, na tentativa de encontrar o protocolo de esforço máximo mais eficaz, isto é, com o qual os animais atingissem os maiores valores de consumo de oxigénio. Com a simples aplicação dos protocolos de Bedford et al (1979) e de Taylor e Weibel (1981), os animais, neste estudo prévio, revelaram, comparativamente ao descrito na literatura (Niederhoffer et al, 2000), valores muito baixos de VO_2 no final daquilo que parecia ser uma prova de esforço máximo, sugerindo uma inadaptação aos protocolos utilizados. Procurou-se, então, desenvolver um protocolo de esforço que melhor se adaptasse aos animais, de forma a avaliar o seu real VO_{2max}. Os animais foram submetidos a diferentes situações de corrida em tapete rolante, com diferentes inclinações,

velocidades e tempos de esforço (Figura 4.1), controlando sempre, para cada protocolo em estudo, estas variáveis assim como a aptidão física do animal no início do teste (recuperação total entre testes), tendo em consideração que o seu não controlo poderia deturpar os resultados.

Para todos os protocolos testados no estudo prévio, o primeiro estágio consistiu numa corrida com velocidade reduzida (0.3 km/h) para a familiarização e o aquecimento dos animais. A seguir, a velocidade do tapete rolante ia sendo aumentada em 0.3 km/h a cada 3 minutos, ou mais, tendo por base os protocolos utilizados noutros estudos (Taylor et al, 1970; Brooks e White, 1978; Bedford et al, 1979; Taylor e Weibel, 1981). A inclinação do tapete constituiu também uma variável em estudo tendo os ratos também sido submetidos a diferentes inclinações do tapete (0°, 10°, 20°, 25°) de acordo com o protocolo de Brooks e White (1978) (Figura 4.1A, B, C e D). Os testes eram interrompidos quando os animais se mostravam incapazes ou não desejavam continuar a correr sobre o tapete. Um leve, mas aversivo choque eléctrico na cauda do animal (1,6 mA) era fornecido na extremidade final do tapete. A aplicação do choque eléctrico foi pouco necessária e, quando o foi, terá sido apenas nas porções finais do teste.

Os critérios usados para determinar se o máximo VO_2 atingido em cada teste correspondia, de facto, ao VO_{2max} do animal, consistiram (i) na obtenção, durante o respectivo tratamento dos dados, de um aumento inferior a 5% nos valores de VO_2 relativamente ao estágio de intensidade imediatamente anterior (Taylor et al, 1955; Taylor et al, 1970) e (ii) na impossibilidade dos ratos se manterem à velocidade do tapete ergométrico, durante o tempo determinado. Ao iniciar o teste com a inclinação de 20°, com alteração posterior para 25° a partir do quinto estágio de esforço (Figura 4.1E), os animais demonstraram os maiores valores de consumo de oxigénio, considerando-se esses valores como representativos do seu VO_{2max}.

A

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	0	0.3	3
2	0	0.6	3
3	0	0.9	3
4	0	1.2	3
5	0	1.5	3
6	0	1.8	3
7	0	2.1	3
8	0	2.4	3
9	0	2.7	3
10	0	3.0	3

B

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	10	0.3	3
2	10	0.6	3
3	10	0.9	3
4	10	1.2	3
5	10	1.5	3
6	10	1.8	3
7	10	2.1	3
8	10	2.4	3
9	10	2.7	3
10	10	3.0	3

C

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	20	0.3	3
2	20	0.6	3
3	20	0.9	3
4	20	1.2	3
5	20	1.5	3
6	20	1.8	3
7	20	2.1	3
8	20	2.4	3
9	20	2.7	3
10	20	3.0	3

D

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	25	0.3	3
2	25	0.6	3
3	25	0.9	3
4	25	1.2	3
5	25	1.5	3
6	25	1.8	3
7	25	2.1	3
8	25	2.4	3
9	25	2.7	3
10	25	3.0	3

E

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	20	0.3	3
2	20	0.6	3
3	20	0.9	3
4	20	1.2	3
5	25	1.5	3
6	25	1.8	3
7	25	2.1	3
8	25	2.4	3
9	25	2.7	3
10	25	3.0	3

Figura 4.1 Características dos testes realizados no estudo prévio, para avaliação do VO_{2max} em tapete ergométrico, com base no protocolo sugerido por Brooks e White (1978) e Taylor e Weibel (1981), com inclinações constantes (**A, B, C e D**) ou variáveis entre os estágios (**E**).

O protocolo de esforço máximo, para avaliação do VO_{2max} estabelecido a partir dos resultados obtidos no estudo prévio, está descrito na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Descrição do teste usado para avaliação do Consumo Máximo de Oxigénio, em tapete ergométrico, durante o protocolo experimental

Estágio	Grau de Inclinação	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Duração (min)
1	20	0.3	3
2	20	0.6	3
3	20	0.9	3
4	20	1.2	3
5	25	1.2	4
6	25	1.5	4 – 5
7	25	1.8	4 – 5
8	25	2.1	4 – 5
9	25	2.4	4 – 5
10	25	2.7	4 – 5

Conforme referido, todos os animais foram submetidos ao teste máximo no início do protocolo experimental e repetiram-no semanalmente, 24 horas após a última sessão de treino da semana (Figura 4.2), para controlo do efeito do treino e da inactividade física, nos animais treinados e não treinados, respectivamente.

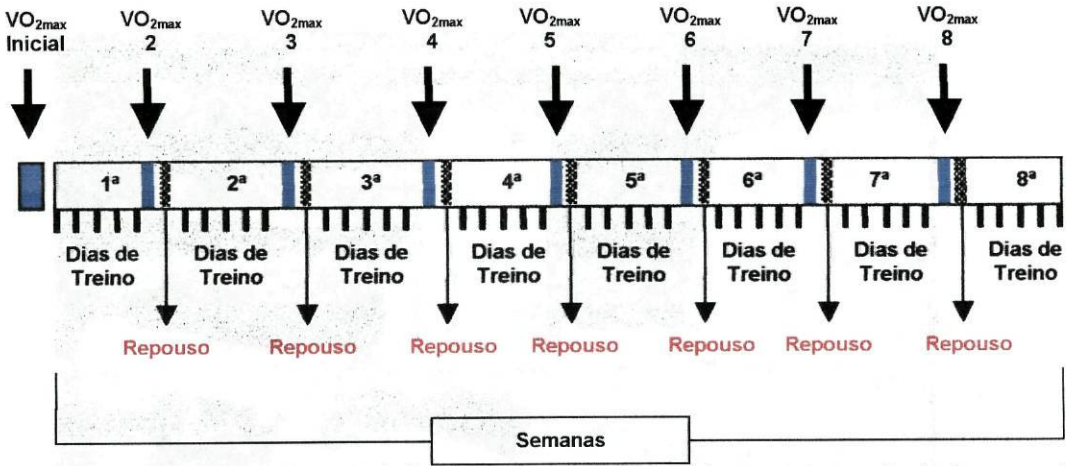


Figura 4.2. Desenho experimental da fase de aplicação do programa de treino ou de manipulação dos animais e da sua relação com os momentos de avaliação do consumo máximo de oxigénio. As barras em azul indicam o dia em que os animais eram avaliados. As barras com padrão indicam o dia de repouso, do treino e da manipulação, para os animais treinados e não-treinados, respectivamente.

4.3. Avaliação do consumo de oxigénio

O consumo de oxigénio (VO_2) foi avaliado através de um circuito aberto de calorimetria (Columbus Instruments' Oxymax Deluxe System) [Figura 4.3]. O sistema regista as concentrações de oxigénio e dióxido de carbono através do volume de entrada e saída de ar de uma câmara. A diferença na concentração dos gases e as informações do fluxo foram empregadas nos cálculos do VO_2, produção de dióxido de carbono (VCO_2) e produção de calor ($kcal.h^{-1}$). O ar foi ventilado de forma forçada para a câmara a uma taxa constante de 2.5 L/min. O sistema foi desenvolvido com sensores de gás estáveis e optimizados para concentrações de gases próximas às condições ambientais. As avaliações foram acuradamente realizadas com leitores que diferiram menos do que 0,1% do ar de entrada e saída. A taxa de fluxo foi ajustada de acordo com o peso corporal dos animais para assegurar alterações na composição do gás expirado (> 0,05%). O fluxo foi controlado e calibrado antes de cada experimento (CO_2 off set = 0.001; CO_2 gain = 0.65%; e O_2 = 21.2%). Para controlar toda a avaliação dos gases, um software (7400 Oxymax Single Chamber) forneceu medidas calorimétricas específicas.

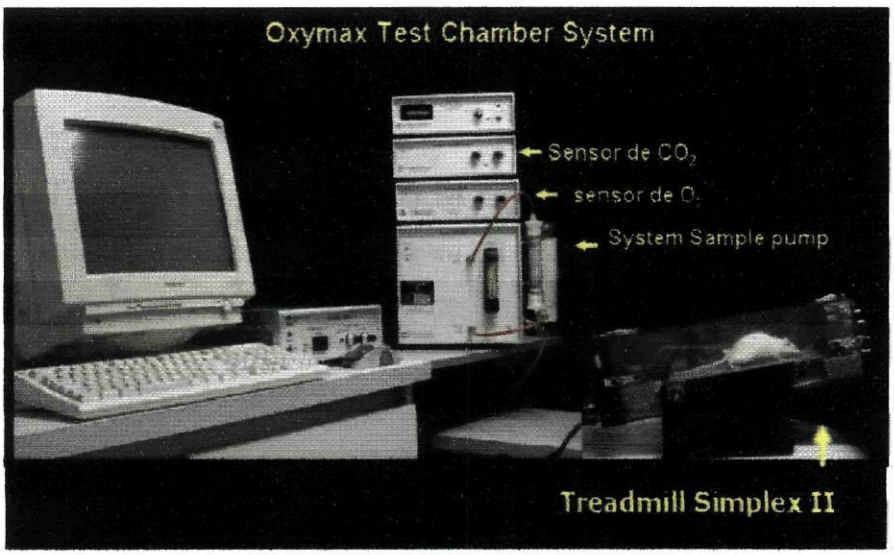


Figura 4.3. – Aparelho utilizado para avaliação do consumo de oxigénio dos ratos.

4.4. Protocolo de treino físico

O grupo de animais treinado foi submetido a um programa de treino físico moderado, em tapete ergométrico (Millenium - Imbramed) [Figura 4.4], enquanto o grupo não treinado permaneceu em suas respectivas gaiolas, estando sujeito apenas a manipulação. O protocolo de treino consistiu de 8 semanas, 5 dias por semana, 60 minutos por dia (com as sessões de treino iniciadas 3 horas após o começo do ciclo escuro) com uma intensidade aproximada de 70% do VO_{2max}.



Figura 4.4. – Tapete ergométrico (Millenium - Imbramed).

O protocolo de treino utilizado no presente estudo é apresentado na tabela 4.2. O programa de treino foi igual para todos os animais devido à homogeneidade observada no comportamento motor dos animais aquando da realização das provas de esforço máximo inicial e no final de cada semana do protocolo experimental. Para cada semana, foi possível ajustar, com rigor, as velocidades do tapete rolante em função da percentagem do VO_{2max} (avaliado no final da semana anterior) pretendida, para cada sessão de treino, ao longo do protocolo experimental. Este ajuste foi possível pelo facto de, em cada dia da semana de treino, dois dos animais do grupo treinado (animais diferentes de dia para dia, de forma alternada) terem realizado os exercícios de treino no circuito aberto de calorimetria, para monitorização do consumo de oxigénio durante os diferentes estágios do programa de treino, adiante descritos. Assim, nos dois animais aos quais, no primeiro dia da semana, se controlava o consumo de oxigénio durante a corrida, era feito um ajuste da velocidade do tapete para atingir, de forma progressiva, a percentagem de VO_{2max} definida previamente para cada estágio. Essas velocidades eram posteriormente aplicadas a todos os animais treinados ao longo da semana e cujos VO_2 eram também controlados nos dias subsequentes.

A primeira semana, destinada apenas à adaptação dos animais ao tapete rolante, consistiu de uma corrida a uma velocidade baixa, efectuada só durante 20 minutos por dia (ver tabela 4.2.). A partir da segunda semana, o protocolo de treino foi dividido em 4 estágios: (i) período de aquecimento (5 minutos); (ii) zona intermediária (20 minutos); (iii) zona de treinamento (30 minutos) e (iv) volta à calma (5 minutos). A intensidade da corrida na zona de treino deveria corresponder a aproximadamente 70% do VO_{2max} avaliado no final de cada semana que antecedia a semana de treino. A velocidade no período de aquecimento (e também na volta a calma) foi fixada em 40% do VO_{2max} dos animais (correspondendo a cerca de 0,5 km/h) por permitir, pela sua baixa intensidade, uma fácil adaptação dos animais no início do exercício. Na zona intermediária, os animais corriam 2 séries de 10 minutos (na 2ª semana fizeram apenas uma série) com velocidades progressivas (ver tabela 4.2.), sem paragens

entre elas, de forma a permitir a adaptação progressiva dos animais à velocidade da zona de treino. Com relação à zona de treino, na segunda semana, utilizamos a velocidade correspondente a 65% do VO_{2max} avaliado na primeira semana (cerca de 0,6 km/h).

Como a velocidade de 0,9 km/h, em plano horizontal, correspondeu a aproximadamente 70% do VO_{2max} (68,1%) medido no final da segunda semana, foi essa a velocidade escolhida para a zona de treino da terceira semana. Na quarta semana, velocidade utilizada para a zona de treino foi de 1,1 km/h por corresponder a 69,1% do VO_{2max} medido no teste máximo realizado no final da terceira semana.

De forma a incrementar a intensidade do exercício sem aumentar a velocidade do tapete rolante, pois o primeiro grupo de animais, no primeiro dia da semana, pareceu demonstrar algumas dificuldades mecânicas em acompanhar a velocidade do tapete rolante, a inclinação do tapete foi aumentada para 5º e a velocidade nos estágios de treino foi mantida na quinta semana de treino, sendo esta intensidade correspondente a 70% do VO_{2max}, avaliado na quarta semana. Para as três últimas semanas de treino, pelas razões atrás apontadas, fixamos a inclinação do tapete em 10º mas mantendo as variações de velocidade entre estágios, para cada sessão de treino, semelhantes às das semanas anteriores, pois os animais mantiveram seu desempenho no teste máximo sem alterações no seu consumo de oxigénio.

Tabela 4.2. Caracterização do protocolo de treino de acordo com a velocidade, a inclinação do tapete e a duração de cada sessão para cada uma das oito semanas de treino.

Semanas	Velocidade ($km.h^{-1}$)	Grau de Inclinação	Duração (min)
Inicial (adaptação)	0.3	0	5
	0.4	0	5
	0.5	0	5
	0.3	0	5
2ª semana	0.4	0	5
	0.5	0	10
	0.6	0	30
	0.4	0	5
3ª semana	0.5	0	5
	0.6	0	10
	0.8	0	10
	0.9	0	30
	0.5	0	5
4ª semana	0.5	0	5
	0.8	0	10
	0.9	0	10
	1.1	0	30
	0.5	0	5
5ª semana	0.5	5	5
	0.8	5	10
	0.9	5	10
	1.1	5	30
	0.5	0	5
6ª semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
7ª semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5
8ª semana	0.5	10	5
	0.8	10	10
	0.9	10	10
	1.1	10	30
	0.5	0	5

Logo após as 8 semanas do protocolo de treinamento ou de manipulação, os dois grupos foram subdivididos, dando origem a quatro grupos experimentais, de acordo com a posterior sujeição, ou não, à situação de contenção (indutora de stress). Assim, os animais treinados foram divididos em dois grupos: o grupo T (n=7), sujeito apenas a treino, e o grupo T+S (n=8), sujeito a treino e, no final, à

situação de contenção aguda. Da mesma forma, os animais não treinados foram também divididos em grupo NT (n=7), sujeito apenas a manipulação, e grupo NT+S (n=8), sujeito a manipulação seguida por exposição à contenção aguda (Figura 4.5).

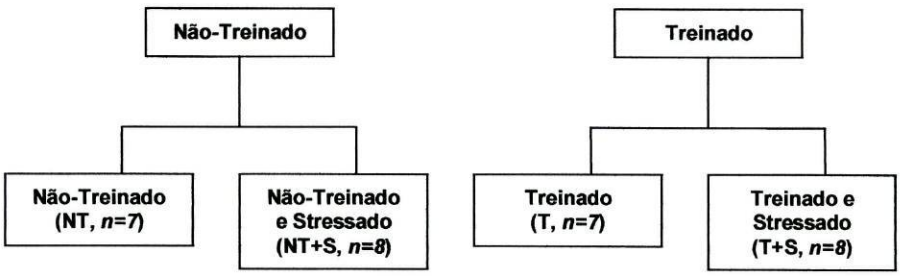


Figura 4.5. Descrição dos grupos experimentais

Para indução da situação de contenção aguda, nos grupos T+S e NT+S, os animais foram colocados num tubo cilíndrico (de 24cm de comprimento por 8cm de largura) onde permaneceram contidos durante 60 minutos (Figura 4.6.), de acordo com a metodologia proposta por Selye (1936). A contenção dos animais teve lugar 24 horas após a última sessão de treino (grupo T+S) ou de manipulação (grupo NT+S). Imediatamente após o período de contenção, os animais foram anestesiados e os tecidos retirados para análise. Os restantes animais foram sujeitos aos mesmos procedimentos (anestesia e recolha de tecidos), 25 horas após a última sessão de exercício (grupo T) ou de manipulação (grupo NT).

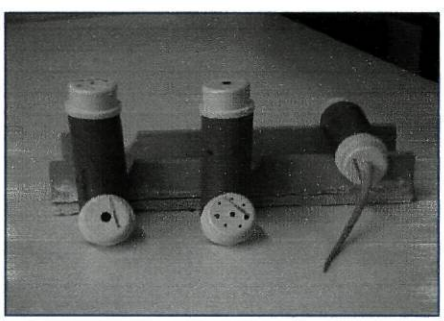


Figura 4.6. - Material utilizado para induzir contenção nos animais.

4.5. Anestesia e recolha dos tecidos

Todos os animais foram anestesiados (hidrato de cloral a 10%, *via i.p.*, na dose de 0,2mL por 100g de peso corporal) e submetidos a cirurgia para exposição da traqueia e posterior realização do lavado broncoalveolar (LBA). O LBA foi adquirido por injecção de PBS (pH = 7,4) à temperatura ambiente, através de uma cânula plástica inserida na traqueia (De Castro et al, 1995). Várias alíquotas de 2mL de PBS foram injectadas e imediatamente colectadas. Ao final, colectou-se um volume de 20mL de LBA por cada animal. O LBA foi centrifugado (10 min, a 470 *g*, 4º C) e as células recuperadas do precipitado (cerca de $3x10^6$ de macrófagos) foram ressuspensas num meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO BRL, New York, USA) suplementado com soro fetal bovino inactivado (10%). Após recolha do LBA, foram colectados 5 mL de sangue num tubo heparinizado (1:10) através de punção cardíaca. Desses, cerca de 2,5 mL foram utilizados para contagem total e diferencial de leucócitos, tendo o restante (2,5 mL) sido centrifugado (10 min, 231 *g*, 4ºC) para obtenção do plasma, o qual foi congelado em tubos eppendorf (a -80º C) para posterior análise bioquímica.

A seguir, o músculo soleus foi retirado de ambas as patas dos animais e armazenado em nitrogénio líquido até à realização do ensaio de avaliação da actividade da enzima citrato sintetase. Os linfonodos mesentéricos, o timo e o baço foram retirados, dissecados e comprimidos num cilindro de malha, de acordo com a técnica de Cheetham et al (1998). Desta técnica foram obtidos linfócitos íntegros e isolados de gordura. Os linfócitos foram mergulhados em solução salina, filtrados em papel de filtro especial (Whatman nº 105) e centrifugados (5 min, 211 *g* a 4º C). Este processo foi repetido 3 vezes. Após a obtenção das células linfóides, foi realizada a contagem total em câmara de Neubauer. Para isto, as células foram diluídas (1:10 v/v) em solução salina e azul de Tripan a 0,1%. Para a contagem foram apenas tidas em consideração as células brilhantes e refringentes à luz, tendo as restantes (coradas de azul) sido consideradas inviáveis.

4.6. Determinação da actividade da enzima citrato sintetase

A actividade muscular da enzima citrato sintetase foi determinada de acordo com a técnica de Alp (1976). O Tampão de extração (pH 7,4) consistiu de Tris/HCL 50 mM e EDTA 1 mM. O tampão de ensaio (pH 8,1) consistiu de Tris/aminometano 100 mM, DTNB 0,2 mM, acetil CoA 0,1 mM, Triton X-100 0,05% (v/v) e o homogeneizado. A reacção foi iniciada com a adição de 50 µL de oxaloacetato (10 mM) ao meio. Foi adicionado ao meio 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoato) [DTNB] formando um complexo amarelo (DTNB-CoA) proporcional à actividade da enzima. A determinação da concentração de proteína foi realizada logo após a determinação da actividade enzimática da citrato sintetase segundo a técnica de Bradford (1976). O resultado da actividade da enzima foi expresso em nmol por minuto por mg de proteína.

4.7. Avaliação dos níveis plasmáticos de corticosterona

As concentrações da corticosterona total no plasma foram analisadas directamente por radioimunoensaio (RIE) segundo a técnica de McEwen (1998). Uma parte da solução de anticorpo (corticosterone antiserum developed in rabbit Sigma$^{\leq}$ cat# C8784) foi diluída em duas partes de PBS 0,01M gel 0,1% e adicionado 2,5µL (ou 3 µL) de [^{3}H]-corticosterona diluída 10x para cada mL de solução total (anticorpo + PBS) de Ac anti-cortico. As amostras foram incubadas a 70°C por 1 hora para que a corticosterona se dissociasse das globulinas plasmáticas. Nas amostras foi adicionado 3mL de líquido de cintilação (Ecolite ICN, Califórnia) e contados num contador β por 1 minuto. Os valores das amostras foram calculados segundo a curva padrão e expressos em µg/100mL (µg%) de plasma.

4.8. Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue

Dos 2,5 mL de sangue destinados à contagem de leucócitos, 0,5 mL foram diluídos (1:20) em solução de TURK (ácido acético a 3%). Os leucócitos totais foram contados numa câmara de volume conhecido (câmara de Neubauer) [Figura 4.7] com auxílio do microscópio óptico (NIKON, Japan). O resultado foi obtido com a fórmula: Leucócitos x mm^3 de sangue = (Lc. x 20 x 10)/4. Onde: Lc = número total de leucócitos contados em $4mm^2$; 4 = factor de conversão para $1mm^3$; 20 = factor de conversão da diluição utilizada; 10 = factor de conversão para $1mm^3$ (profundidade da lâmina). Para contagem diferencial de leucócitos foi utilizada a técnica do esfregaço sanguíneo. Para coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Depois de seca, a lâmina foi examinada ao microscópio óptico com objectiva de 100x sob imersão.

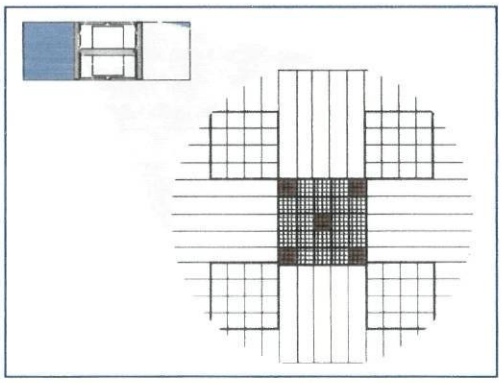


Figura 4.7. – Câmara de Neubauer para contagem total de leucócitos.

Para contagem diferencial dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ foi utilizado a técnica de Vissher e Crissman (1994). Para isso, o restante sangue (2 mL da amostra) foi diluído em solução de hemólise (Tris base - 1,0297 mg + NH_4Cl - 3,8513 mg - pH 7,4) e permaneceu no gelo por 20 min. A amostra foi centrifugada (10min, 231 *g*, 4° C) e o procedimento repetido por mais duas vezes. Foram utilizados anticorpos anti-CD4 de rato (marcado com CyChrome, Pharmingen,

diluição 1:100) e anticorpos anti-CD8 de rato (marcado com FITC, Pharmingen, diluição 1:250). As células (n= 5 x 10^5) foram ressuspensas em 25 μL da mistura de anticorpos e incubadas por 30 min a 4 °C. A seguir, foi realizada a leitura no citómetro de fluxo (Becton Dickinson, San Juan, CA, EUA). Antes de analisar as amostras, o citómetro foi calibrado com o controlo negativo que permitiu identificar a fluorescência basal das células. Os controlos, marcados somente com um anticorpo, foram utilizados para compensar o sinal que um fluorocromo emite no comprimento de onda do outro. O fluorocromo verde isotiocianato de fluoresceína (FITC) é excitável por laser de argónio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1). O fluorocromo Cy-Chrome é excitável por laser de argónio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 650-680 nm (FL3).

4.9. Contagem diferencial de linfócitos do timo, baço e linfonodos mesentéricos

Os linfócitos (n= 1x10^6) foram centrifugados durante 10 minutos, a 231 *g*, a 4°C. Foram utilizados anticorpos anti-CD4 (de rato marcado com CyChrome, Pharmingen) e anti-CD8 (de rato marcado com FITC, Pharmingen). As células (n= 5 x 10^5) foram ressuspensas em 25 μL da mistura de anticorpos e incubadas por 30 minutos a 4 °C. A seguir, foi realizada a leitura no citómetro de fluxo. O citómetro foi calibrado com o controlo negativo que permitiu identificar a fluorescência basal das células.

4.10. Análise da Integridade da membrana celular

Os linfócitos (n= 1x10^6) do sangue, dos linfonodos mesentéricos, do timo e do baço foram colectados como descrito anteriormente e, após a centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em 500 μL de PBS. Foram adicionados 50 μL de solução de iodeto de propídio (PI) (50 μg/mL em PBS) e as células foram

analisadas no citómetro de fluxo de acordo com a técnica de Nicoletti et al (1991). A fluorescência foi mediada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas. Os histogramas foram analisados através do "Cell Quest Software" (Becton Dickinson) [Figura 4.8].

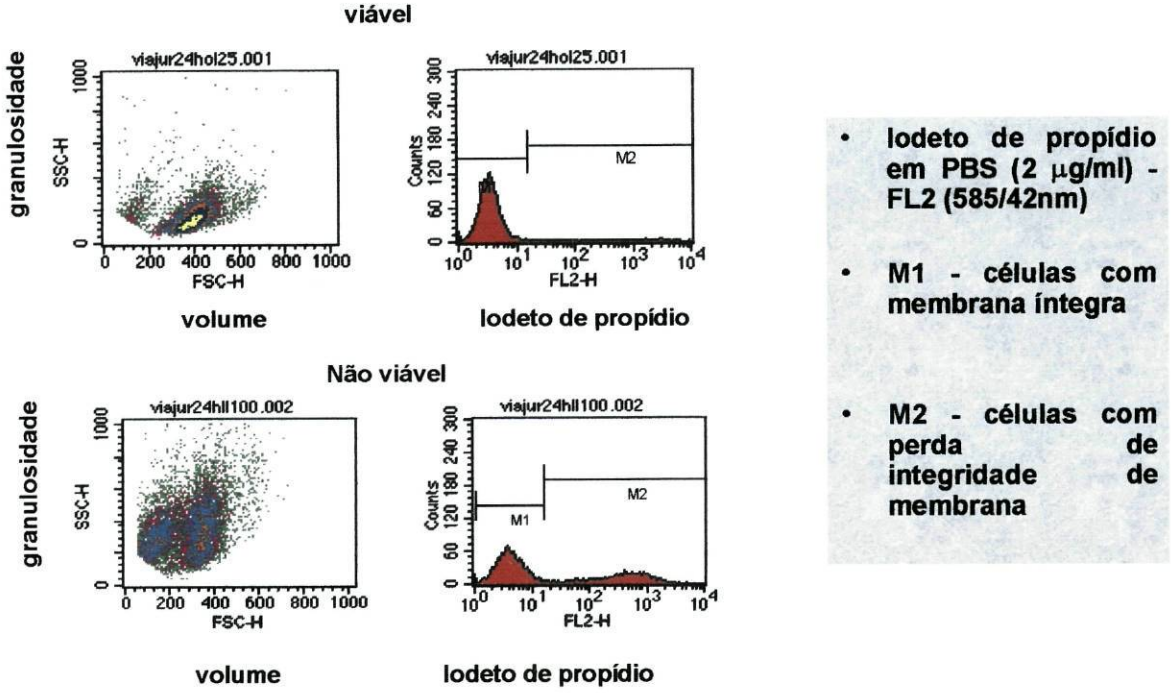


Figura 4.8. - Histogramas ilustrando a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) por células de duas amostras diferentes. Células íntegras não permitem a passagem de iodeto de propídeo pela membrana e, portanto, emitem baixa fluorescência. Células que apresentam membranas rompidas permitirão a entrada do iodeto de propídeo, que se ligará ao DNA, emitindo alta fluorescência quando excitadas pelo laser.

4.11. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

Os linfócitos (n= 1 x 10^6) do sangue, dos linfonodos mesentéricos, do timo e do baço foram colectados como descrito anteriormente. Estas células foram ressuspensas em 1 mL de solução salina, adicionado 1 μL de solução de rodamina 123 (5mg/mL em etanol) e incubadas por 10 min a 37°C segundo a

técnica de Pithon-Curi et al (2003). As células foram lavadas com PBS duas vezes, ressuspensas em 0,5 mL de PBS e incubadas por 30 minutos a 37°C. A leitura foi realizada no citómetro de fluxo imediatamente após a incubação. A Rodamina 123 (corante fluorescente catiónico) é excitável por laser de argónio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (FL1). É permeável à membrana celular e é rapidamente sequestrado pela mitocôndria. Células com potencial mitocondrial transmembrânico inalterado captam a rodamina e emitem alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (Figura 4.9).

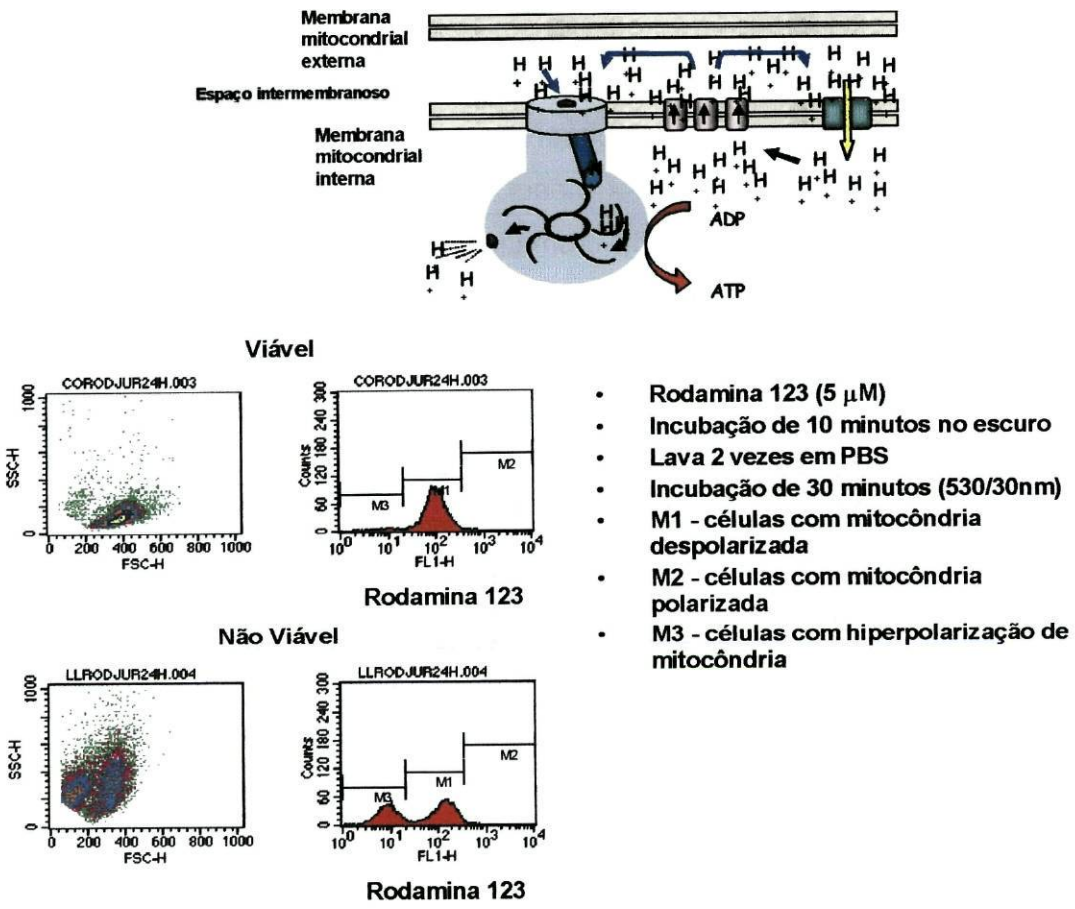
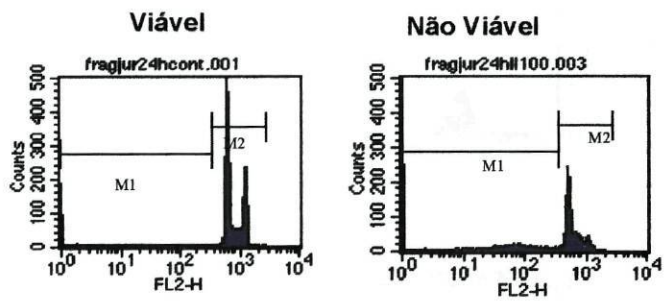


Figura 4.9. Histogramas que mostram a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 515-530 nm (FL1) por células de duas amostras diferentes.

4.12. Fragmentação de DNA por citometria de fluxo

Os linfócitos (0,5 a 1 x 10^6) do sangue, dos linfonodos mesentéricos, do timo e do baço foram colectados como descrito anteriormente. As células foram ressuspensas em 200 μL do tampão de lise contendo iodeto de propídeo (0,1 % citrato de sódio, 0,1% Triton X-100, 2μg/mL iodeto de propídeo) e incubadas ao abrigo da luz por até 24 h a 4 °C de acordo com a técnica de Nicoletti et al (1991). A leitura no citómetro de fluxo foi realizada imediatamente após a incubação. O iodeto de propídeo é excitável por laser de argónio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm (FL2). As células foram rompidas pelo tampão de lise e os núcleos expostos. O iodeto de propídeo se ligará ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitirão alta fluorescência. A condensação de cromatina e a fragmentação de DNA podem ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isto se deve à menor marcação do DNA com o iodeto de propídeo devido à condensação da cromatina. Além disso, pedaços menores de DNA captam menos iodeto de propídeo, emitindo menor fluorescência (Figura 4.10).



- **Iodeto de propídio (2 μg/ml) + 0,1% triton-X100 + 0,1% de citrato de sódio**
- **Incubação de 2h a temperatura ambiente**
- **M1 - DNA fragmentado**
- **M2 - conteúdo de DNA íntegro**

Figura 4.10. Histogramas que mostram a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2) por células de duas amostras diferentes.

4.13. Análise da proliferação de linfócitos

Os linfócitos colectados dos linfonodos mesentéricos, timo e baço (n= $2x10^5$) foram incubados em meio de cultivo RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μL), a 37° C em atmosfera de 95% ar/5% CO_2, por 24 e 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com Concanavalina A (ConA) e Lipopolissacarídeos (LPS), adicionando-se 20 μL de uma solução hidroalcoólica dos mitógenos nos poços, na concentração final de 5 μg/mL e 20 μg/mL, respectivamente. Após 48 horas de cultivo foram adicionados 20 μL de [2-^{14}C]-Timidina (0,02 μCi/poço) e as células foram incubadas por um período adicional de 18 horas, sob as mesmas condições. Após este período, o conteúdo dos poços foi transferido para papéis filtro n° 11731 (Skatron Combi, UK) através da utilização de um colector múltiplo de células (Skatron Multiple Cell Harvester, UK). Os discos de papel filtro contendo a radioactividade incorporada pelo DNA das células cultivadas foram transferidos para *vials* contendo líquido de cintilação e levados para mensuração em contador Beckman LS6500. Os dados de proliferação dos linfócitos foram expressos como incorporação de [2-^{14}C]-Timidina através do índice de estimulação:

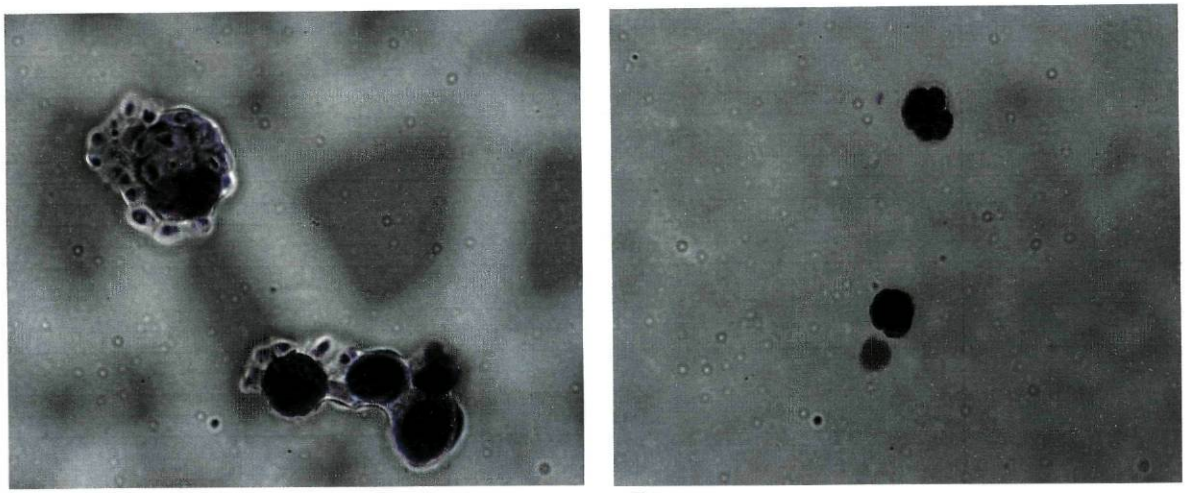
$$\text{Índice de Estimulação} = \frac{\text{Incorporação de [2-}^{14}\text{C]-Timidina na presença de ConA/LPS}}{\text{Incorporação de [2-}^{14}\text{C]-Timidina na ausência de ConA/LPS}}$$

4.14. Taxa de fagocitose de macrófagos broncoalveolares em resposta à estímulo com *Escherichia Coli*

Para avaliação da taxa de fagocitose de macrófagos broncoalveolares, utilizamos o Vybrant Phagocytosis Assay Kit (Molecular Probes Oregon, USA). O kit contém BioParticulas de fluorescein-labeled *Escherichia Coli* (K-12 strain) e solução azul de Tripan. As amostras de *E. coli* foram descongeladas em concentrado de HBSS e brevemente sonicadas. Foram então misturados 100μL da suspensão das BioPartículas fluorescentes à suspensão de macrófagos ($1x10^6$ por mL de meio de cultura completo, RPMI 1640) e incubados por 2 horas. A seguir, foi adicionado 200μL de azul de Tripan e incubado novamente por 30 minutos. Foram realizados controlos positivos e negativos para leitura em citometria de fluxo.

4.15. Taxa de fagocitose em resposta à estímulação com Zimosan

Foi utilizado $1x10^7$ partículas de Zimozan. A seguir, foi adicionado o mesmo volume de soro controlo da mesma espécie em estudo (rato). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C, sob agitação lenta. Após o tempo decorrido, o zimosan (Zimosan A de *Saccharomyces cerevisiae*) (Sigma Z-4250), já opsonizado, foi centrifugado. A amostra foi ressuspensa em meio de cultura RPMI. O volume do meio foi calculado conforme o número de amostras, sendo 500 μL para cada. Os macrófagos (n= $1x10^6$/mL) foram incubadas por 40 minutos na presença de $1x10^7$ partículas de Zimosan, previamente opsonizadas. Após a incubação, foi pipetado 190 μL desta solução contendo os macrófagos e o Zimosan e 10 μL de cristal violeta, homogeneizado e armazenado para realização da contagem. Critério de contagem - células que fagocitaram que englobaram pelo menos três partículas foram consideradas. Células que não fagocitaram: foram as que não englobaram nenhuma partícula. Assim, as células que englobaram uma ou duas partículas não foram consideradas (Figura 4.11).



A B

Figura 4.11. Lâmina com macrófagos que fagocitaram partículas de Zimosan. (A) macrófagos que fagocitaram, (B) macrófagos que não fagocitaram.

4.16. Análise estatística

As variáveis estão expressas como média e erro padrão da média (EPM). Para comparação entre os grupos não-treinado e treinado do consumo máximo de oxigénio, do ganho de peso corporal e da actividade da enzima citrato sintetase, foi utilizado o T-teste *student* de medidas independentes.

A comparação entre os grupos dos níveis de corticosterona e das variáveis imunológicas, foi efectuada recorrendo à Análise de Variância (ANOVA) multifactorial. Para evidências de significado estatístico *post hoc*, recorreu-se ao teste de TUKEY. O nível de significância foi mantido em 5%.

Toda a análise estatística foi calculada utilizando o programa SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A apresentação dos resultados está dividida em duas partes. Na primeira, são apresentados os resultados do consumo de oxigénio registados no estudo prévio, nos diferentes testes máximos e nos exercícios diários nas várias semanas de treino. Nesta primeira parte são ainda apresentados os resultados da variação do peso corporal e da actividade muscular da enzima citrato sintetase. Na segunda parte são apresentados os resultados dos níveis plasmáticos de corticosterona e dos parâmetros imunológicos em função da situação de contenção e do treino efectuado.

1ª PARTE

5.1. Consumos de oxigénio

O consumo de oxigénio em função das diferentes velocidades e dos graus de inclinação do tapete rolante durante o estudo prévio está apresentado na figura 5.1A. Os maiores valores (75,3 ± 1,2 $ml.kg^{-1}.min^{-1}$) foram encontrados quando o teste se iniciou com o tapete rolante a 20° de inclinação e foi posterior alterado para 25° de inclinação, quando a velocidade de corrida atingiu os 1.2 km/h. A figura 5.1B apresenta os incrementos do consumo de oxigénio em cada estágio (comparativamente ao estágio anterior) relativo ao consumo de oxigénio registado no estágio anterior, em função da velocidade, registados no teste do estudo prévio efectuado com inclinação 20° + 25°. É de referir que, no último estágio (velocidade 2.1 km/h), comparativamente ao penúltimo, a variação do consumo de oxigénio foi menor que 5%, satisfazendo os critérios previamente definidos para $VO2_{max}$.

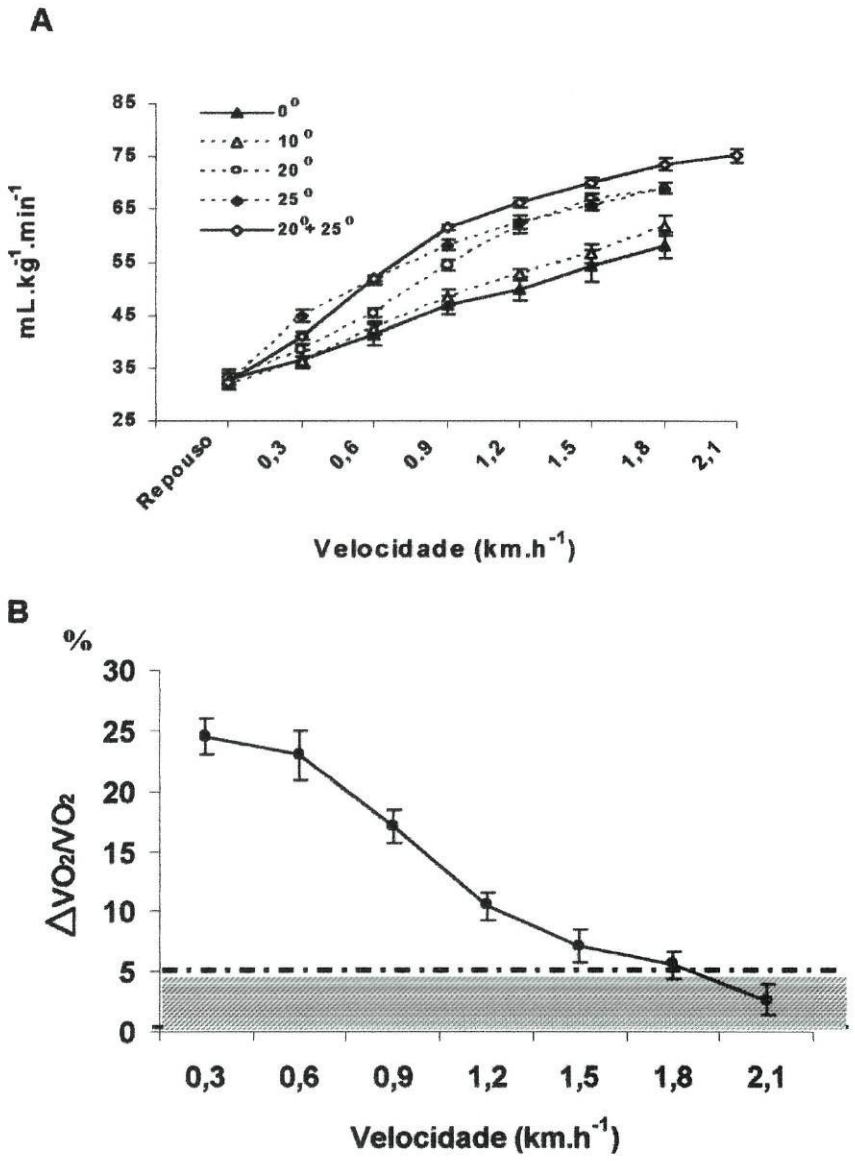


Figura 5.1A: Valores médios ± EPM do consumo de oxigénio a diferentes velocidades e com diferentes graus de inclinação do tapete. **5.1B:** Variação percentual do consumo de oxigénio em cada estágio (relativo ao consumo de oxigénio do estágio anterior = 100%) em função da velocidade nos diferentes estágios durante o teste com a inclinação 20º + 25º. Os valores são expressos em média ± EPM.

A figura 5.2 apresenta os valores do VO_{2max} dos animais ao longo das oito semanas que durou o protocolo experimental. Durante todo o experimento, os animais submetidos ao protocolo de treino mantiveram seus valores de VO_{2max} semelhantes aos valores obtidos no teste máximo inicial. A partir da terceira semana, os ratos NT foram progressivamente diminuindo seus valores de VO_{2max} comparativamente aos ratos T e ao seu respectivo valor inicial.

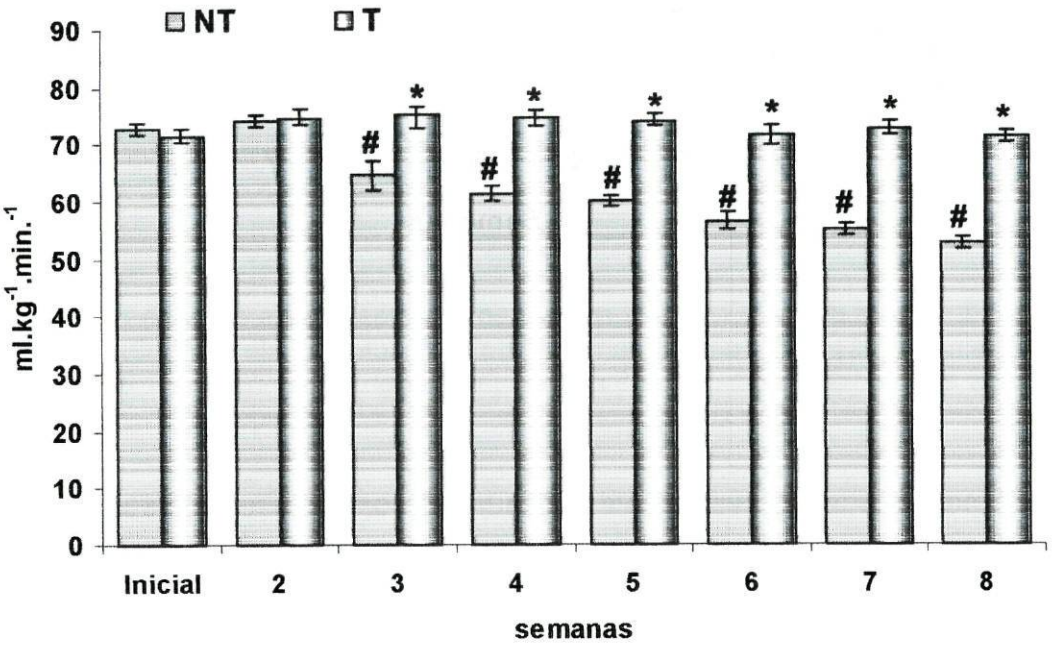


Figura 5.2. Valores do VO_{2max} dos animais submetidos ao programa de treino (T) ou não (NT) ao longo de 8 semanas. Os valores são expressos em média ± EPM. $^{*}p<0.05$ quando o grupo T foi comparado, em cada instante, ao NT, e $^{\#}p<0.05$ quando os valores em cada grupo foram comparados ao seu valor inicial.

Com relação ao ganho de peso corporal ao longo do experimento, ambos os grupos apresentaram um aumento (Figura 5.3). Os animais do grupo T foram progressivamente apresentando um menor aumento no ganho de peso corporal comparativamente aos animais do grupo NT, mas este só se tornou significativo a partir da quinta semana. Foi também verificado uma correlação negativa entre o ganho de peso e a distância média percorrida em cada teste ao longo das 8 semanas de experimento no grupo NT ($r= - 0,81$, $p<0.05$).

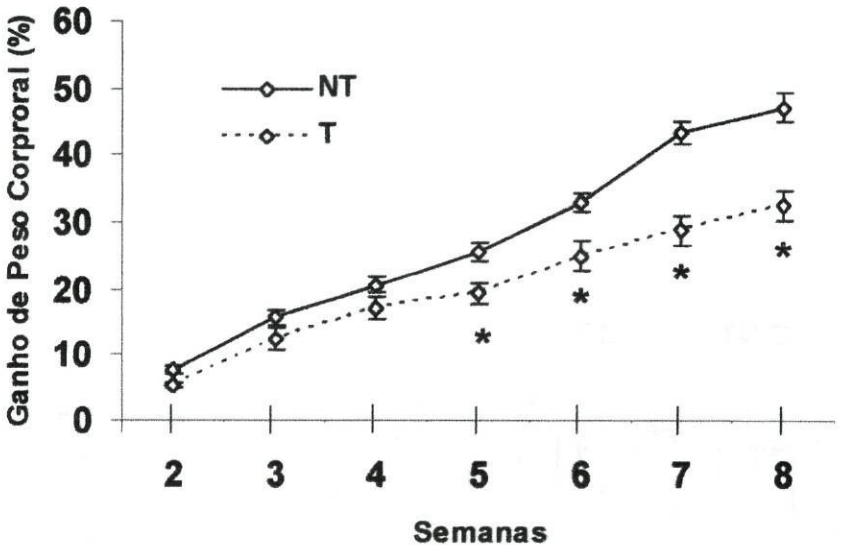
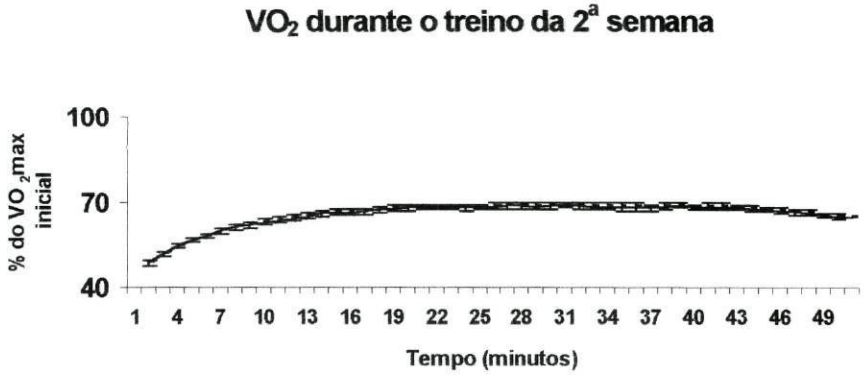
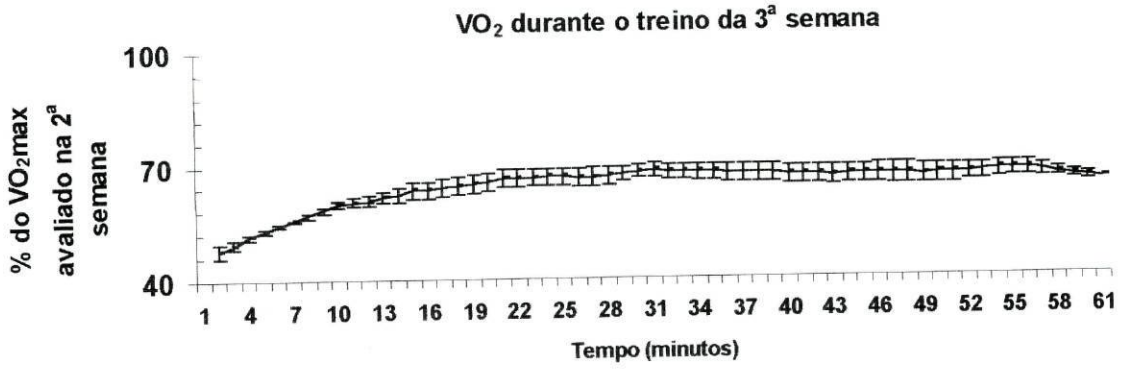
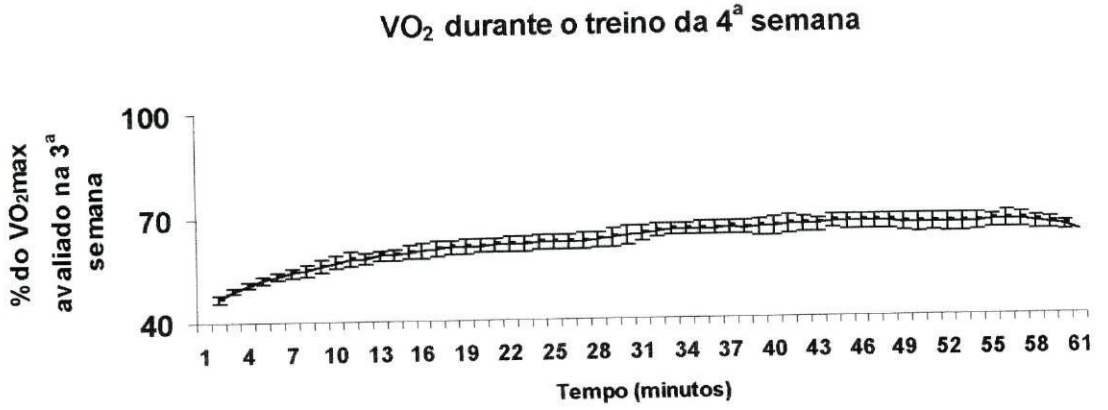


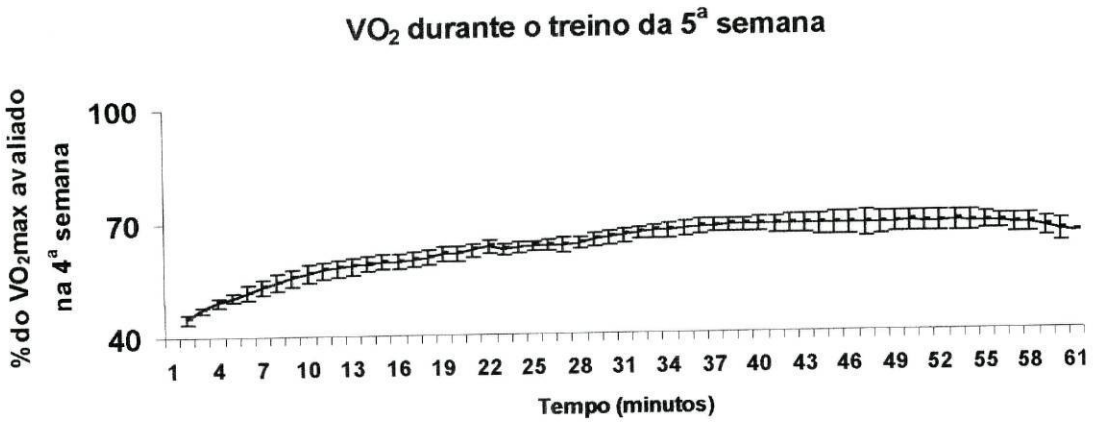
Figura 5.3. Ganho de peso corporal relativo aos valores iniciais de ratos não treinados (NT) e treinados (T) durante as 8 semanas do protocolo experimental. Os valores são expressos em média ± EPM. *p<0.05 na comparação entre os grupos NT e T para cada instante.

A percentagem de variação do consumo de oxigénio relativa aos valores do VO_{2max} (avaliados na semana anterior) para cada semana de treino ao longo do protocolo de treino é mostrado na figura 5.4. Os valores médios deste percentual, em todas as semanas, não ultrapassaram os 70% do respectivo VO_{2max} (avaliado no final da semana anterior).




VO2 durante o treino da 3ª semana
% do VO2max avaliado na 2ª semana
100
70
40
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61
Tempo (minutos)


VO2 durante o treino da 4ª semana
% do VO2max avaliado na 3ª semana
100
70
40
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61
Tempo (minutos)


VO2 durante o treino da 5ª semana
% do VO2max avaliado na 4ª semana
100
70
40
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61
Tempo (minutos)

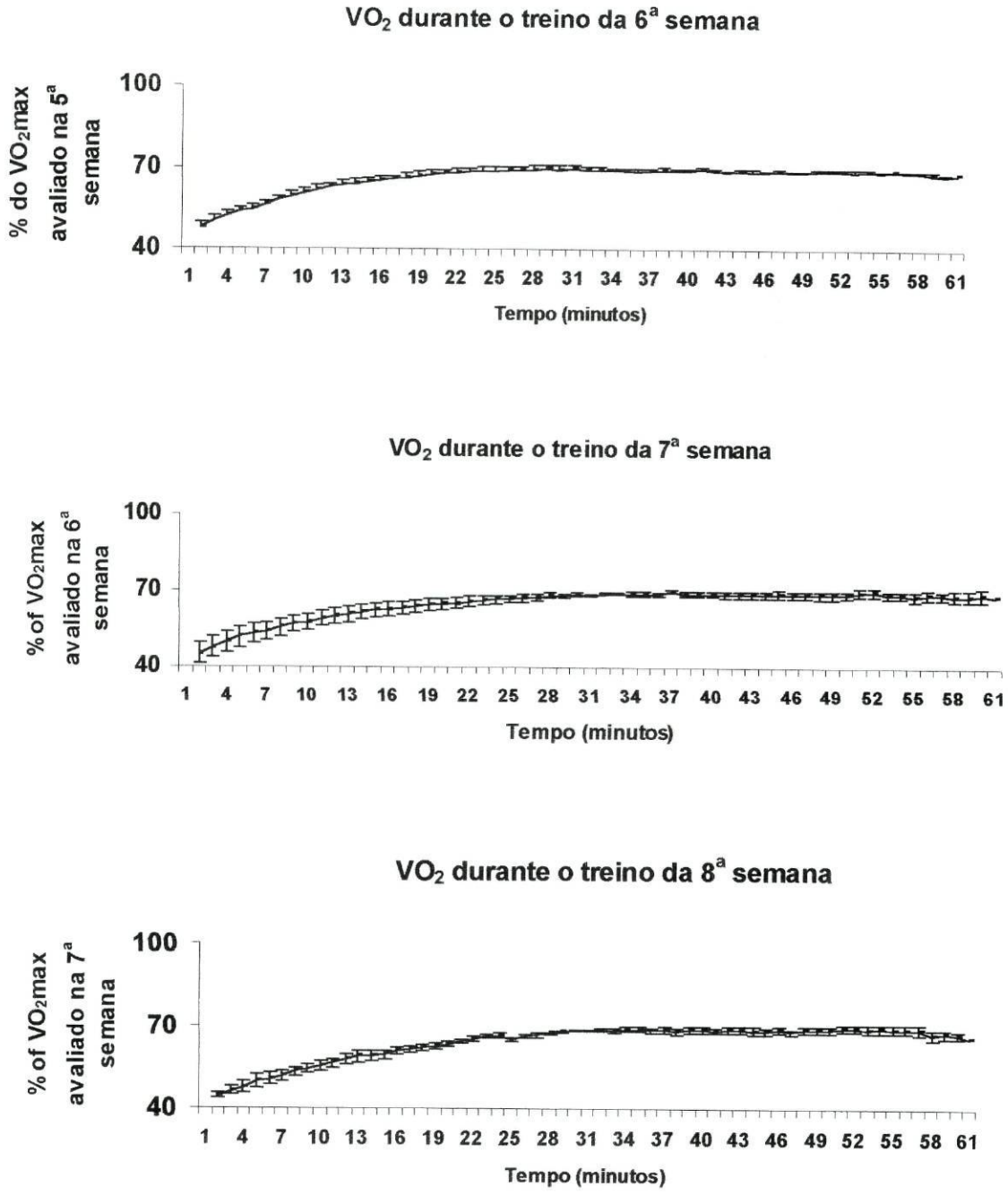


Figura 5.4. Representação gráfica dos valores médios ± EPM da percentagem de variação do consumo de oxigénio (VO_2) relativa aos valores máximos desse consumo (VO_{2max} avaliado no final da semana anterior) para cada semana, ao longo do protocolo de treino.

5.2. Actividade da enzima Citrato Sintetase

Comparativamente ao grupo NT, foi encontrado um aumento de 42% na actividade da enzima citrato sintetase do músculo soleus dos animais treinados (NT = 344.66 ± 20.6 e T= 488.44 ± 15.5 $nmol^{-1}.min^{-1}.mg$ $proteina^{-1}$, $p<0.05$), como demonstrado na figura 5.5.

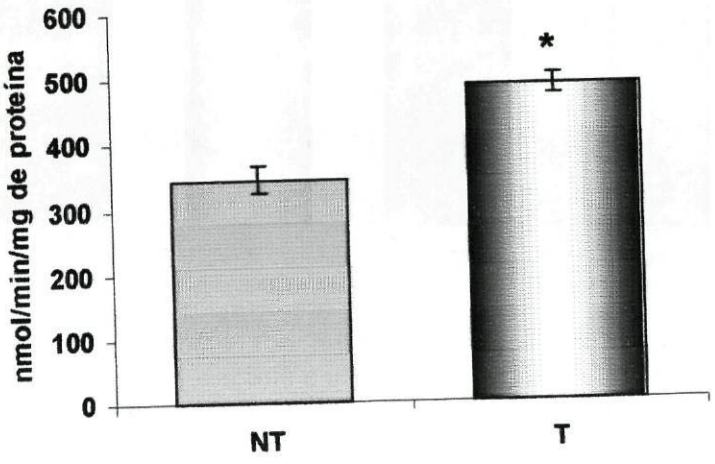


Figura 5.5. Valores médios ± EPM da actividade da enzima citrato sintetase nos músculos soleus dos animais não-treinados (NT) e treinados (T) no final do protocolo experimental. * $p<0.05$.

2ª PARTE

5.3. Níveis plasmáticos de corticosterona

Os animais do grupo NT+S apresentaram um aumento nos níveis de corticosterona plasmática em relação ao grupo NT e ao grupo T+S (NT= 55.6 ± 0.9; NT+S= 66.9 ± 1.8; T=53.7 ± 2.7; T+S=51.9 ± 3.1) como demonstrado na figura

5.6. Entre os grupos NT e T, assim como entre os grupos T e T+S, não foram encontradas diferenças significativas.

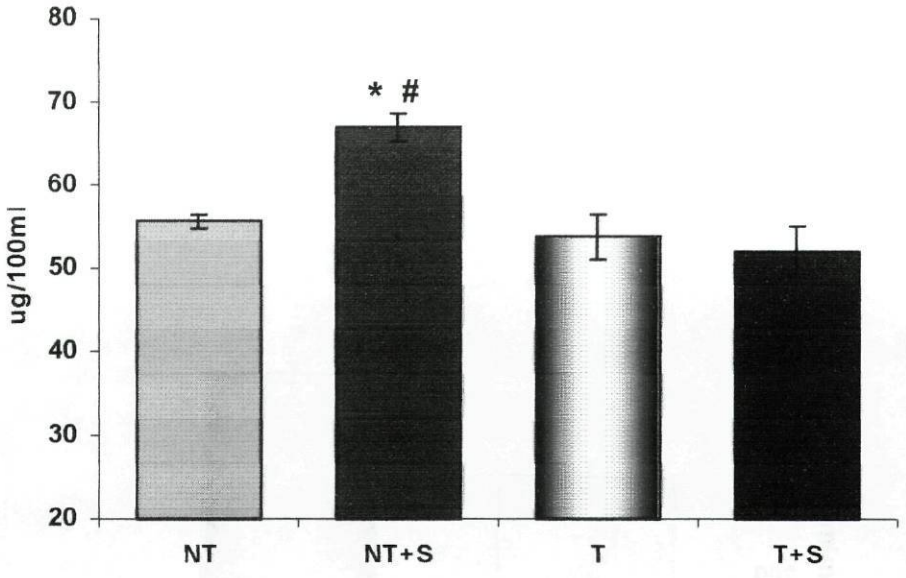


Figura 5.6. Níveis plasmáticos de corticosterona dos animais dos diferentes grupos estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs. grupo NT. # p< 0,05 vs. grupo T+S.

5.4. Contagem de leucócitos do sangue

Os valores médios e respectivos EPM das sub-populações de leucócitos do sangue estão apresentados na tabela 5.1. Quando comparado ao NT, os animais do grupo T apresentaram um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ e na relação de linfócitos TCD4+/CD8+. Os animais do grupo NT+S apresentaram uma diminuição na contagem total de leucócitos, no percentual de linfócitos totais, de linfócitos TCD4+ e na relação de linfócitos T CD4+/CD8+ com relação ao grupo NT e ao grupo T+S. Houve um aumento no percentual de segmentados, monócitos e linfócitos TCD8+ quando o grupo NT+S foi comparado ao grupo NT. Estas alterações também foram verificadas no grupo NT+S com relação ao grupo T+S com excepção do percentual de linfócitos TCD8+. O percentual de células

não-T aumentou no grupo NT+S relativamente ao grupo T+S. O grupo T+S apresentou uma diminuição no percentual de células não-T e um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ quando comparado ao NT.

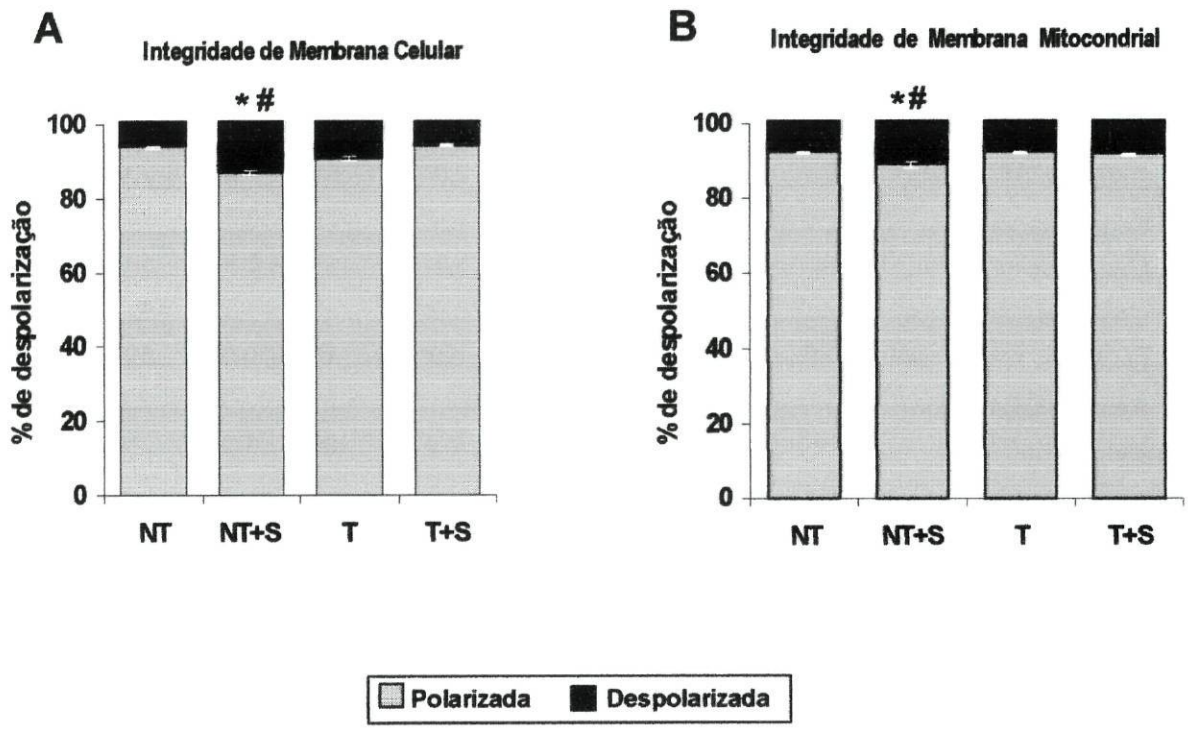
Tabela 5.1. Contagem total e diferencial (em % do total) de leucócitos e contagem diferencial de linfócitos (em % do total) do sangue periférico nos diferentes grupos estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). *p<0,05 vs NT, # p<0,05 vs T+S.

Células	Grupos			
	NT	NT+S	T	T+S
Leucócitos Totais (10^6/mL)	9,4 ± 0,3	6,1 ± 0,3*#	9,2 ± 0,4	7,9 ± 0,5
Linfócitos (%)	73,8 ± 0,8	54,2 ± 2,0*#	71,0 ± 1,2	69,3 ± 1,1
Segmentados (%)	17,4 ± 0,5	27,3 ± 1,4*#	18,5 ± 0,7	20,5 ± 1,2
Monócitos (%)	8,6 ± 0,7	18,4 ± 1,7*#	10,1 ± 0,9	10,1 ± 0,8
Linfócitos TCD4+ (%)	40,2 ± 0,9	32,1 ± 0,6*#	43,7 ± 1,1*	45,8 ± 0,6
Linfócitos TCD8+ (%)	18,5 ± 0,4	23,1 ± 0,8*	16,8 ± 0,6#	19,9 ± 0,5
Relação CD4+/CD8+	2,2 ± 0,02	1,3 ± 0,01*#	2,6 ± 0,03*	2,3 ± 0,02
Células não T (%)	41,5 ± 0,9	42,1 ± 1,1#	39,9 ± 1,2#	31,7 ± 0,7

5.5. Indicadores de apoptose nos linfócitos do sangue

Os resultados dos três indicadores de apoptose (integridade de membrana celular, integridade de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA) avaliados nos linfócitos do sangue, estão apresentados na Figura 5.7. Com relação ao grupo NT, o grupo T não apresentou alteração nos indicadores estudados. Quando comparado ao NT, o grupo NT+S apresentou uma diminuição no percentual de células com membrana celular íntegra (NT= 93,9 ± 1,0 e NT+S= 86,97 ± 1,3, p<0,05), no percentual de células com membrana mitocondrial polarizada (NT = 92,2 ± 1,1 e NT+S = 88,8 ± 2,4, p<0.05) e um aumento no percentual de células

com DNA fragmentado (NT = 7,83 ± 0,4 e NT+S = 11,01 ± 0,9, $p<0,05$). A mesma tendência foi observada quando NT+S foi comparado ao grupo T+S no que diz respeito ao percentual de células com membrana celular íntegra (T+S = 94,0 ± 1,3), ao percentual de células com membrana mitocondrial polarizada (T+S = 91, 8 ± 0,7) e ao percentual de células com o DNA fragmentado (T+S = 4,66 ± 0,1).



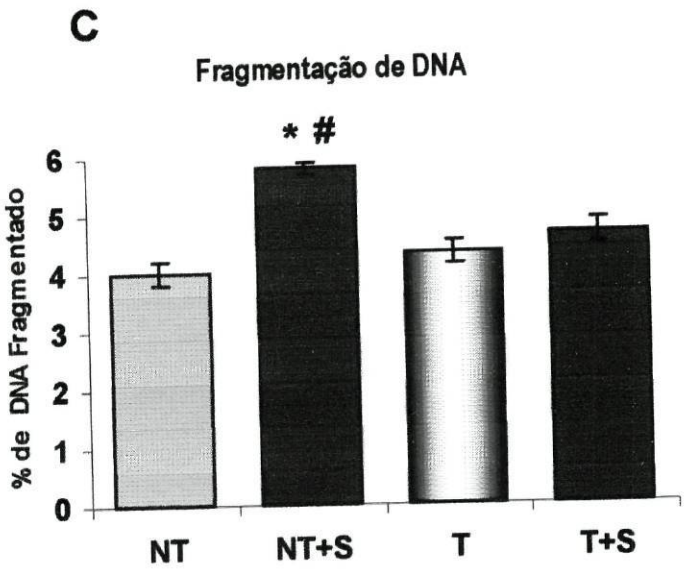


Figura 5.7. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do sangue. A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado. Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ vs NT; # $p<0,05$ vs T+S.

5.6. Sub-populações de linfócitos T do timo

No timo, não foram observadas diferenças quando o grupo T foi comparado ao grupo NT em todos os percentuais de linfócitos avaliados. O grupo NT+S apresentou uma diminuição em relação aos linfócitos TCD4+CD8+ e um aumento nos linfócitos $TCD4^-CD8^-$ comparados ao grupo NT. O grupo NT+S apresentou uma diminuição no percentual de linfócitos TCD4+ com relação ao grupo T+S (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T do timo nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. *p<0,05 vs NT, # p<0,05 vs T+S.

Células	Grupos			
	NT	NT+S	T	T+S
Linfócitos T CD4+ (%)	9,3 ± 0,8	8,9 ± 0,4#	10,4 ± 0,5	11,4 ± 0,8
Linfócitos T CD8+ (%)	9,7 ± 0,6	9,7 ± 0,5	11,1 ± 0,9	11,7 ± 0,7
Relação CD4+/CD8+	0,97 ± 0,01	0,92 ± 0,01	1,0 ± 0,01	0,99 ± 0,01
Linfócitos TCD4+CD8+ (%)	68,7 ± 0,8	62,8 ± 1,0*	65,7 ± 1,2	65,7 ± 0,8
Linfócitos TCD4$^-$CD8$^-$ (%)	12,5 ± 0,9	15,2 ± 0,9*	12,6 ± 1,0	13,9 ± 1,0

5.7. Indicadores de apoptose de linfócitos do timo

A integridade de membrana celular, o percentual de membrana mitocondrial despolarizada e a fragmentação de DNA de linfócitos do timo foram avaliados nos animais dos diversos grupos experimentais e estão apresentados na Figura 5.8. Os grupos NT e T não diferiram nos três indicadores de apoptose estudados. O grupo NT+S apresentou uma diminuição, tanto no percentual de linfócitos com membrana celular íntegra (NT = 93,9 ± 1,7 e NT+S = 87,85 ± 1,3, $p<0.05$) como no percentual de membrana mitocondrial polarizada (NT = 90,6 ± 1,3 e NT + S = 86,71 ± 1,7, $p<0.05$), quando comparado ao grupo NT. Os grupos T e T+S não diferiram entre si nos três indicadores. O grupo NT+S apresentou uma diminuição do percentual de células com membrana celular íntegra, em relação ao grupo T+S (T+S = 91,8 ± 2,0). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos relativamente ao percentual de fragmentação de DNA de linfócitos do timo, (NT = 2,78 ± 0,2; NT + S = 3,59 ± 0,3; T = 2,66 ± 0,2 e T+S = 3,37 ± 0,2; $p>0.05$).

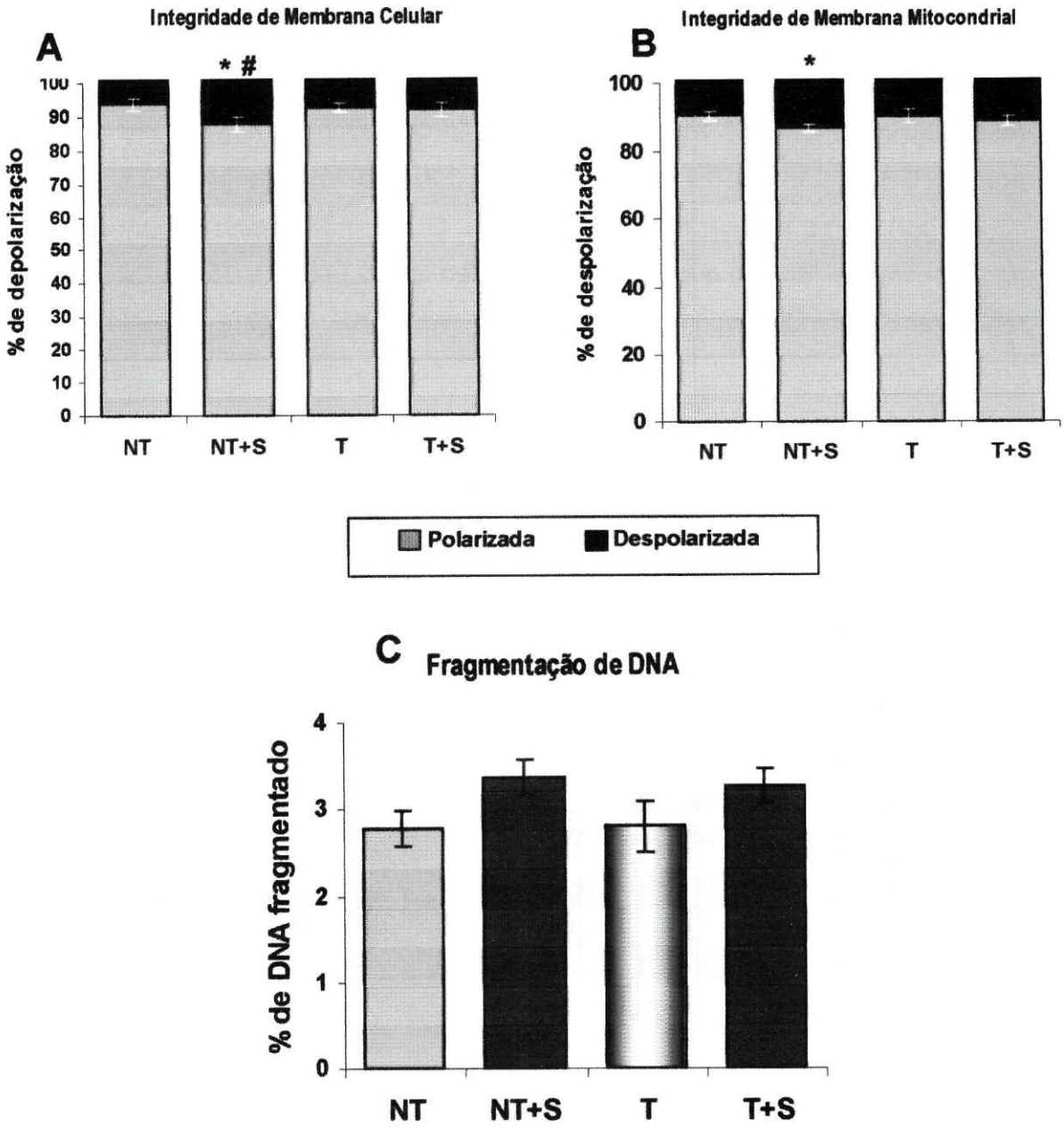


Figura 5.8. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do timo: A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado. Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ vs NT; # $p < 0,05$ vs T+S.

5.8. Análise da proliferação de linfócitos do timo

Os animais do grupo T não diferiram do grupo NT com relação ao índice de estimulação de linfócitos do timo. O grupo NT+S apresentou uma diminuição na resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo com ConA quando comparado ao grupo NT (NT = 16,1 ± 0,7; NT+S = 10,9 ± 0,3; $p<0,05$) e ao grupo T+S (T+S = 13,2 ± 0,9), como apresentado na figura 5.9. O grupo T apresentou um aumento na resposta proliferativa quando comparado ao grupo T+S (T = 15,3 ± 0,3). Não se registaram diferenças significativas entre os grupos na resposta ao estímulo com LPS.

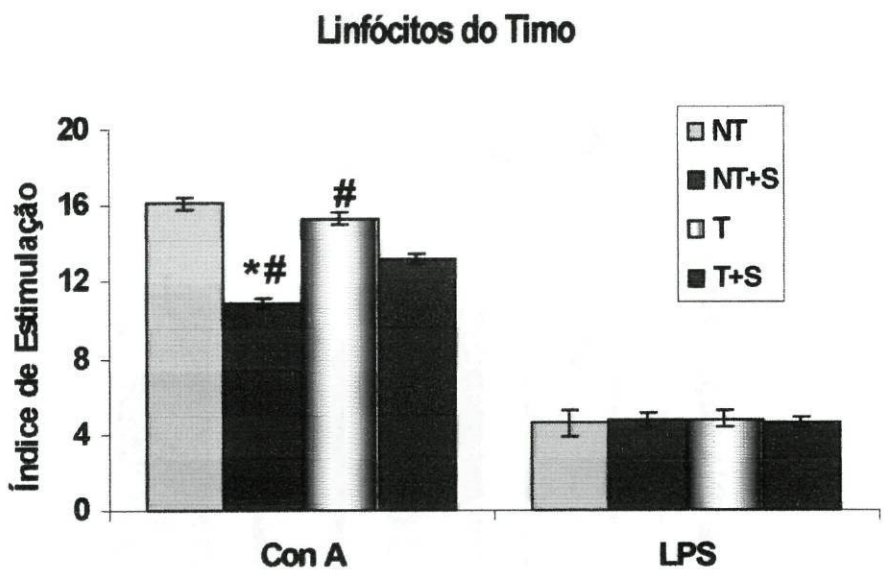


Figura 5.9. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos do timo. Valores expressos em média ± EPM. *p< 0,05 vs NT; # p<0,05 vs T+S.

5.9. Sub-populações de linfócitos T do baço

Quando comparado ao grupo NT, o grupo T apresentou um aumento no percentual de células não-T como apresentado na tabela 5.3. O grupo NT+S diferiu do grupo NT com relação aos valores percentuais médios de linfócitos TCD4+, relação CD4+/CD8+ e no percentual de células não-T do baço. A relação CD4+/CD8+ foi menor no grupo T quando comparado ao grupo T+S. O grupo NT+S apresentou diferença em todos os percentuais de linfócitos estudados, assim como na relação CD4+/CD8+ com relação ao grupo T+S.

Tabela 5.3. Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T do baço nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * $p< 0,05$ vs NT. # $p< 0,05$ vs T+S.

Células	Grupos			
	NT	NT+S	T	T+S
Baço				
Linfócitos TCD4+ (%)	42,2 ± 1,1	34,1 ± 1,3*#	37,7 ± 1,4	41,7 ± 0,8
Linfócitos TCD8+ (%)	13,1 ± 0,5	14,9 ± 1,0#	13,3 ± 0,7	11,8 ± 0,2
Relação CD4+/CD8+	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0,2*#	2,7 ± 0,1#	3,5 ± 0,1
Células não T (%)	44,5 ± 1,1	51,3 ± 0,8*#	48,9 ± 1,2*	46,3 ± 1,0

5.10. Indicadores de apoptose de linfócitos do baço

A integridade de membrana celular e a integridade de membrana mitocondrial de linfócitos do baço não apresentaram diferença nos grupos estudados (Figura 5.10). Por outro lado, os grupos NT+S e T apresentaram um aumento no percentual de linfócitos com DNA fragmentado quando comparados ao grupo NT (NT = 2,26 ± 0,05; NT+S = 3,1 ± 0,1; T = 2,8 ± 0,1; $p<0.05$). Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo NT+S e T+S (2,8 ± 0,08).

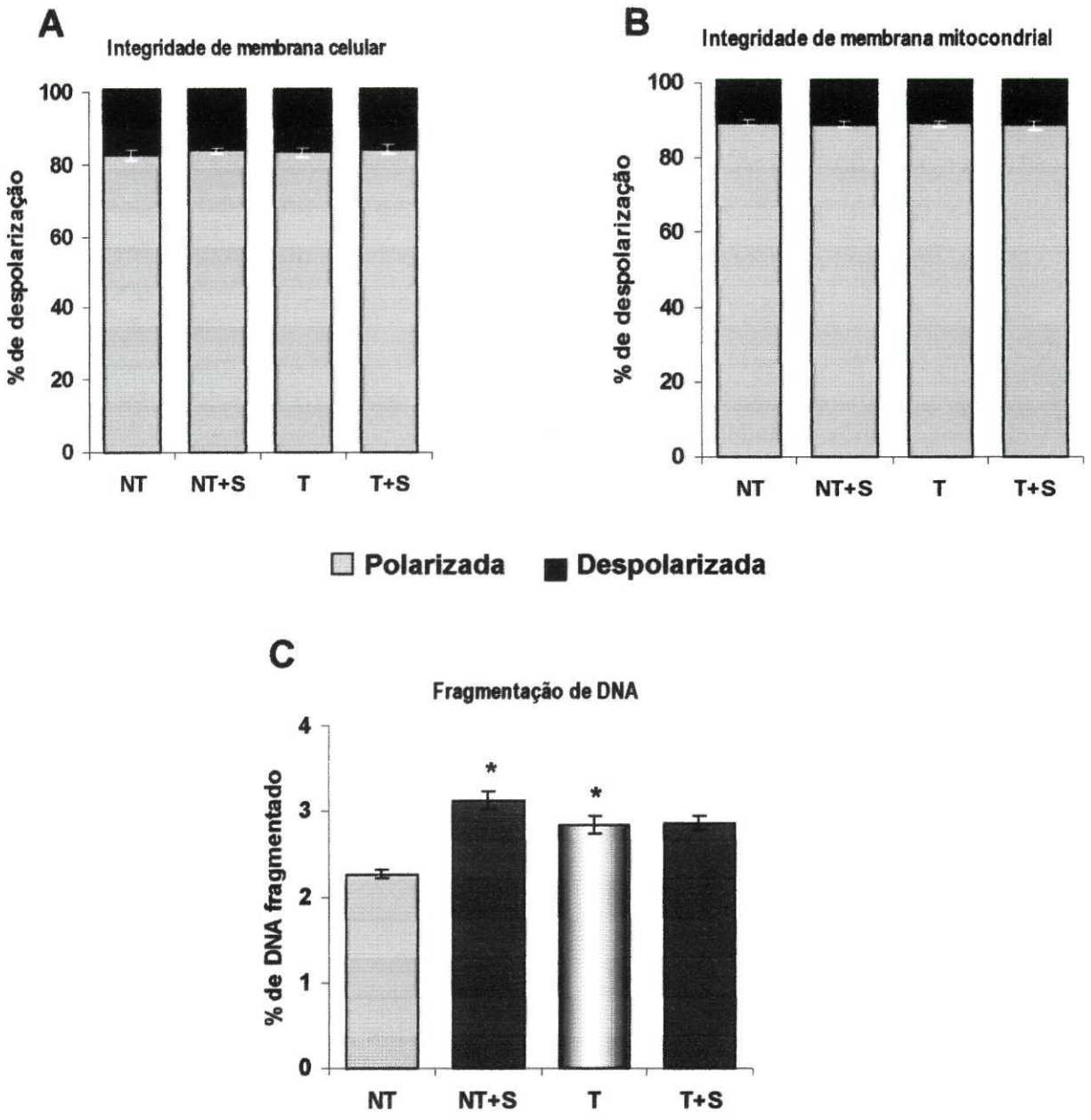


Figura 5.10. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos do baço: A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado.Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ vs NT;

5.11. Análise da proliferação de linfócitos do baço

Com relação ao índice de estimulação de linfócitos do baço, não se registaram diferenças significativas entre os grupos NT e T (NT = 5,4 ± 0,1 e T = 5,3 ± 0,2). O grupo NT+S (7,5 ± 1,1) apresentou um aumento estatisticamente significativo relativamente ao grupo NT e ao grupo T+S (6,0 ± 0,2). Os grupos não diferiram entre si em relativamente à resposta ao estímulo com LPS (Figura 5.11).

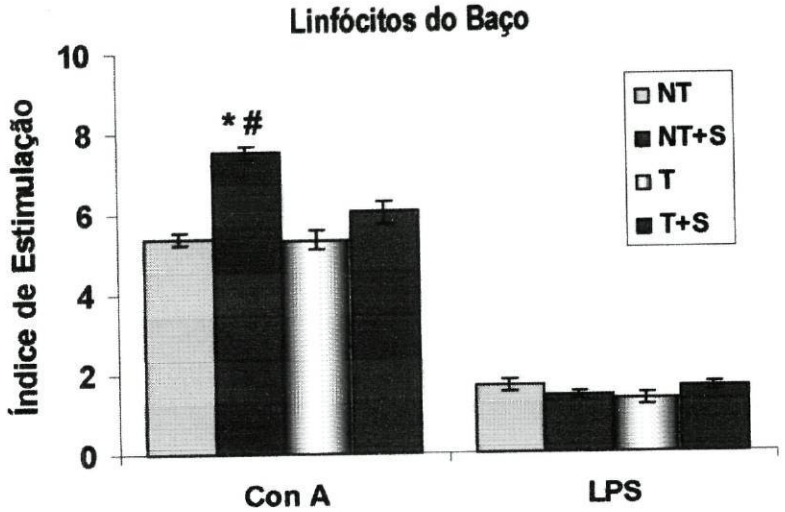


Figura 5.11. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos do baço. Valores expressos em média ± EPM. * $p < 0,05$ vs NT. # $p < 0,05$ vs T+S

5.12. Sub-populações de linfócitos T dos linfonodos mesentéricos

Nos linfonodos mesentéricos, o grupo T apresentou um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ e uma diminuição do percentual de linfócitos não-T, quando comparado ao grupo NT. O grupo NT+S apresentou um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ e uma diminuição no percentual de células não-T relativamente ao grupo NT. O grupo T diferiu do grupo T+S em todas os percentuais de células estudadas, com excepção dos linfócitos TCD4+. O grupo NT+S apresentou uma diminuição no percentual de linfócitos TCD4+ e de células

não-T assim como uma diminuição na relação de linfócitos TCD4+/CD8+, tal como a tabela 5.4 documenta.

Tabela 5.4. Valores percentuais das várias subpopulações de linfócitos T dos linfonodos mesentéricos nos diferentes grupos de animais estudados (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S). Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT. # p< 0,05 vs T+S.

Células	Grupos			
	NT	NT+S	T	T+S
Linfócitos T CD4+ (%)	52,4 ± 0,3	44,8 ± 0,5*#	55,8 ± 0,6*	54,0 ± 0,4
Linfócitos T CD8+ (%)	10,8 ± 0,3	14,6 ± 0,2*	11,9 ± 0,5#	14,4 ± 0,3
Relação CD4+/CD8+	4,8 ± 0,1	3,1 ± 0,07*#	4,7 ± 0,2#	3,7 ± 0,1
Células não T (%)	36,7 ± 0,5	36,5 ± 0,4#	29,3 ± 0,4*#	31,4 ± 0,3

5.13. Indicadores de apoptose de linfócitos dos linfonodos mesentéricos

Relativamente aos indicadores de apoptose de linfócitos dos linfonodos mesentéricos (Figura 5.12), o grupo T apresentou uma diminuição significativa no percentual de células com DNA fragmentado quando comparado ao grupo NT (NT = 5,5 ± 0,2 e T = 4,4 ± 0,1; p<0.05). O grupo NT+S apenas diferiu do grupo NT e T+S no que respeita ao percentual de células com membrana mitocondrial íntegra (NT = 94.8 ± 1.0; NT+S = 90.3 ± 1.5; T+S = 95,05 ± 0.9; p<0,05). Não houve diferenças significativas entre os grupos T e T+S em nenhuma variável analisada. A integridade da membrana celular e o percentual de células com DNA fragmentado não diferiram entre os grupos que NT+S e T+S.

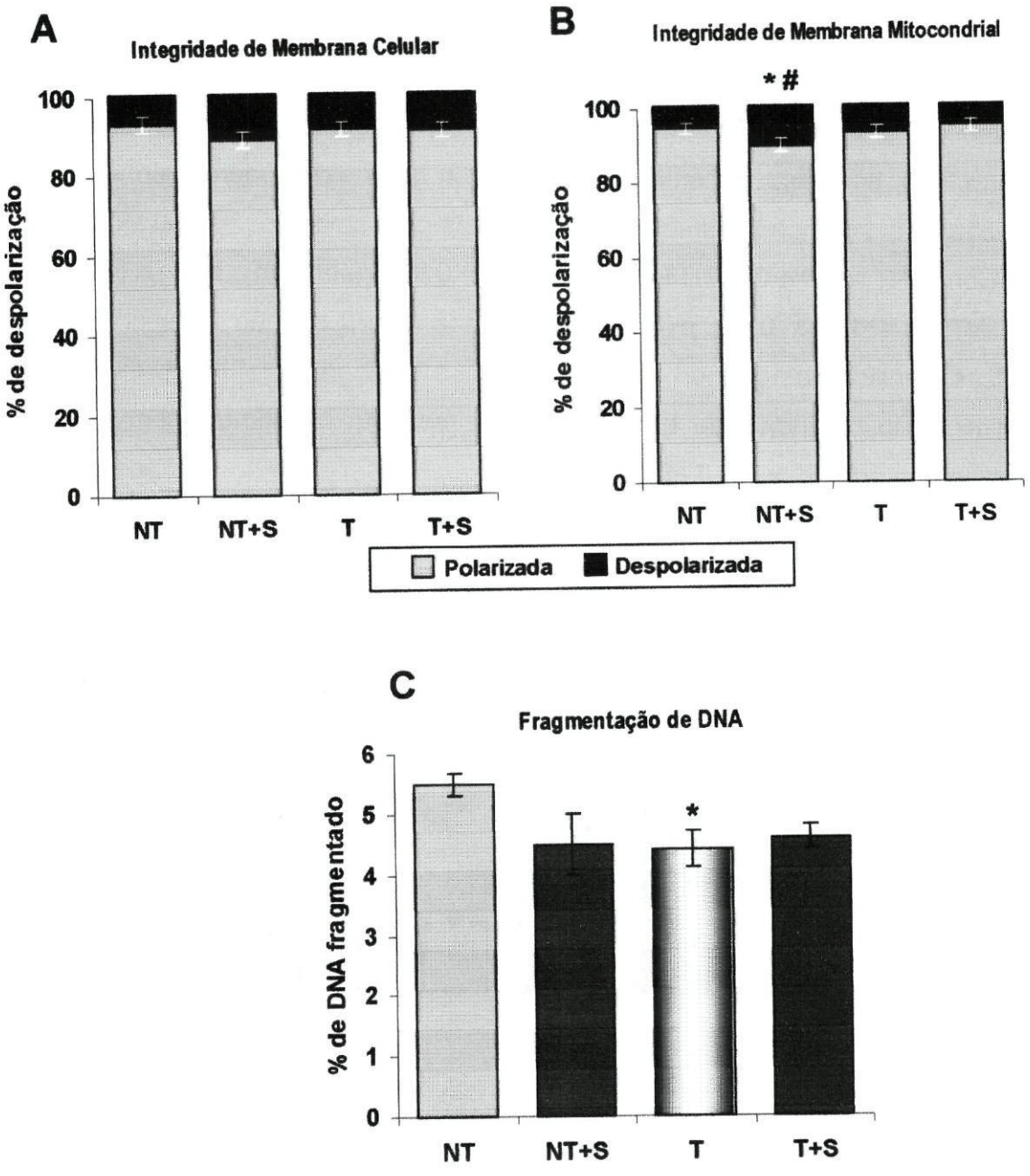


Figura 5.12. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação aos diferentes indicadores de apoptose em linfócitos dos linfonodos mesentéricos: A) integridade de membrana celular; B) integridade de membrana mitocondrial e C) percentual de células com DNA fragmentado. Valores expressos em média ± EPM. * p< 0,05 vs NT; # p<0,05 vs T+S.

5.14. Análise da proliferação de linfócitos dos linfonodos mesentéricos

Com relação ao índice de estimulação de linfócitos dos linfonodos mesentéricos, o grupo T não diferiu significativamente do grupo NT (Figura 5.13). Por outro lado, comparativamente ao grupo NT, o grupo NT+S demonstrou uma diminuição, com significado estatístico, na resposta para ambos os estímulos, quer com a ConA (NT = 7,0 ± 0,3; NT+S = 4,3 ± 0,2; $p<0,05$), quer com o LPS (NT = 2,4 ± 0,1; NT+S = 1,6 ± 0,02; $p<0,05$). Os grupos T e T+S não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si. O grupo NT+S apresentou uma diminuição no índice de estimulação em resposta a estímulo com ConA quando comparado ao grupo T+S (6,9 ± 0.2).

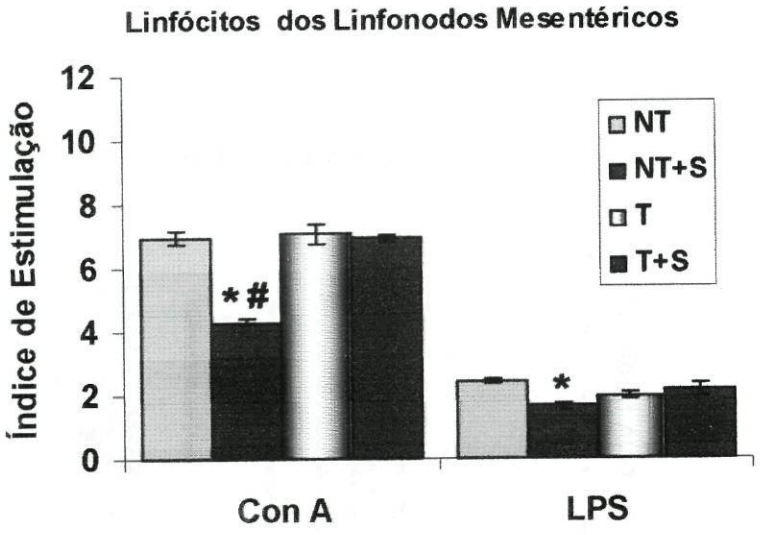


Figura 5.13. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação índice de estimulação de linfócitos dos linfonodos mesentérico. Valores expressos em média ± EPM. * $p< 0,05$ vs NT. # $p<0,05$ vs T+S.

5.15. Taxa de fagocitose de macrófagos broncoalveolares

A taxa de fagocitose de macrófagos broncoalveolares, em resposta ao estímulo com *E. Coli*, não se alterou no grupo T quando comparado ao grupo NT (NT = 72,9 ± 1,5; T = 74,7 ± 0,8; $p<0,05$). O grupo NT+S (61,5 ± 1,2) apresentou uma diminuição significativa tanto em relação ao grupo NT como ao grupo T+S (T+S = 75,5 ± 1,2). Os grupos T e T+S não diferiram significativamente entre si (Figura 5.14).

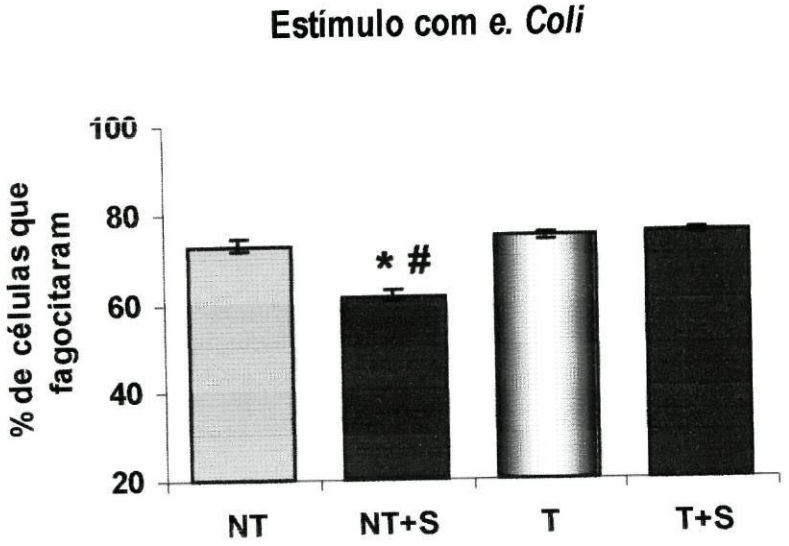


Figura 5.14. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação à taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares em resposta ao estímulo com *e. coli*. Valores expressos em média ± EPM. * $p< 0,05$ vs NT. # $p<0,05$ vs T+S.

O mesmo perfil dos resultados foi encontrado na taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares em resposta ao estímulo com *Zimosan* (NT = 76,3 ± 1,1; NT+S= 56,0 ± 0,8; T= 73,7 ± 1,8; T+S = 69,7 ± 2,8) como demonstrado na figura 5.15.

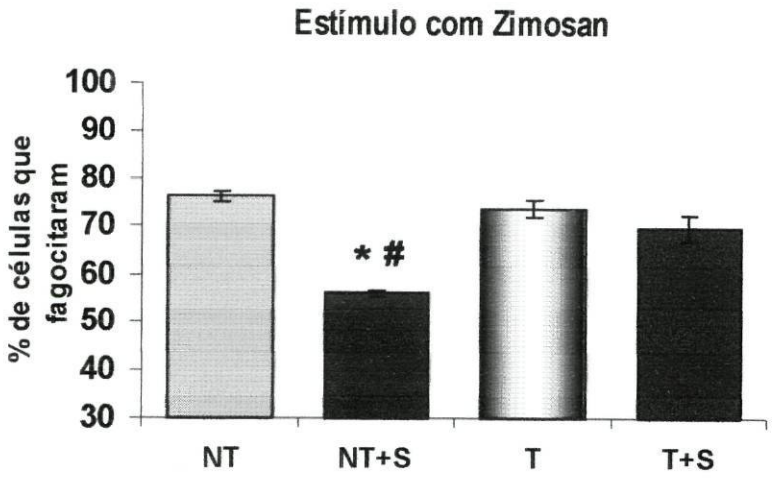


Figura 5.15. Análise comparativa entre os grupos experimentais (não treinado – NT; não treinado sujeito a stress – NT+S; treinado – T; treinado sujeito a stress – T+S) com relação a taxa de fagocitose de macrófagos bronco-alveolares em resposta ao estímulo com *zimosan*. Valores expressos em média ± EPM. * $p< 0,05$ vs NT. # $p<0,05$ vs T+S.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Considerações gerais sobre o estudo

O presente estudo pretendeu verificar qual o efeito do treino físico moderado em aspectos da resposta imunológica de ratos induzida pela situação de contenção aguda. Para tanto, e particularmente no que respeita ao treino físico, estabelecemos um protocolo de esforço máximo de corrida, no tapete rolante, para determinar o consumo máximo de oxigénio dos ratos antes da aplicação do protocolo experimental e, também, para avaliar a eficácia e a especificidade do programa de treino implementado. O nível de treino dos ratos foi avaliado pela determinação da actividade da enzima citrato sintetase no músculo soleus. De forma a evitar que a resposta crónica ao treino físico fosse adulterada pelas alterações orgânicas agudas induzidas pela última sessão de exercício, houve a preocupação de apenas sacrificar os animais 24 horas após a última sessão de treino. Os animais submetidos a contenção foram sacrificados imediatamente no final do procedimento, altura ideal para estudar os parâmetros imunes analisados de forma a os poder correlacionar com os níveis plasmáticos de corticosterona. De facto, as acções dos glucocorticóides são exercidas a partir de 40 minutos após o início da contenção devido à sua actuação a nível genómico (Bauer et al, 2001).

De uma forma geral, o treino físico moderado, por si só, não pareceu ter alterado a dinâmica de células imunes em circulação, a distribuição de linfócitos em compartimentos imunes, os indicadores de apoptose e, em geral, a funcionalidade de linfócitos e macrófagos. Por outro lado, a situação de contenção promoveu alterações nos parâmetros imunes avaliados, muitos dos quais podendo ser indicadores de imunossupressão, como a diminuição na relação de linfócitos TCD4+/CD8+ do sangue, diminuição na composição celular do timo, do baço e dos linfonodos mesentéricos. Na presença deste estímulo, os animais apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, indicador biológico de activação do eixo HPA (Gaillard et al, 1994). Ainda em resposta à situação de contenção, este trabalho revelou um aumento do número de linfócitos

com indicadores de apoptose em órgãos linfóides e no sangue. Ocorreu uma diminuição na taxa de proliferação de linfócitos do timo e dos linfonodos mesentéricos assim como um aumento da proliferação de linfócitos do baço, em resposta ao estímulo mitogénico. Da mesma forma, a função fagocítica de macrófagos foi diminuída em resposta ao stress. Estes resultados sugerem que o aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, associado ao stress agudo, pode ser um factor importante na génese dos efeitos deletérios do stress, afectando a concentração, a viabilidade e a função de linfócitos do sangue e de órgãos linfóides e ainda, a função de macrófagos.

No entanto, os animais treinados e submetidos posteriormente à situação de contenção, não apresentaram as alterações anteriormente relatadas. As evidências aqui disponíveis sugerem que o treino moderado tenha efeitos moduladores importantes na dinâmica e na função de células imunes quando o organismo é sujeito à acção de estímulos agressores. Estes dados sugerem fortemente que o treino físico induziu tolerância cruzada, ao nível da resposta do sistema imune, atenuando significativamente a intensidade das respostas orgânicas agudas estudadas à situação de contenção.

Considerações sobre o consumo de oxigénio no teste máximo e durante o treino

No presente estudo, os animais foram controlo deles mesmos durante os testes de VO_{2max} e durante o protocolo de treino. Ao estudar o mesmo animal antes e após a conclusão de um programa de treino, estamos a atenuar factores intimamente associados com a variabilidade inter-individual, que podem influenciar e confundir os resultados (Seeherman et al, 1981).

O protocolo de teste máximo do presente estudo foi baseado no protocolo de teste máximo proposto por Brooks e White (1978) e Bedford et al (1979). Devido à variação do VO_{2max} descrita com a idade, o sexo, o peso corporal e com a linhagem dos animais, e tendo em consideração a especificidade do grupo de animais que seriam utilizados neste estudo, decidimos modificar ligeiramente o

protocolo de teste máximo sugerido por aqueles autores. Pelo facto dos ratos da linhagem Wistar parecem apresentar dificuldades mecânicas em acompanhar altas velocidades no tapete ergométrico (Brooks e White, 1978), uma das alterações que efectuámos consistiu no aumento do tempo de corrida nos estágios finais de esforço. O estudo preliminar, utilizando animais da mesma estirpe, do mesmo sexo e da mesma idade, permitiu-nos constatar que o aumento da velocidade de corrida sem que os animais estejam ainda adaptados à velocidade do patamar anterior promoverá a finalização precoce do exercício, não por ter sido alcançado o esforço máximo, mas pela aparente incapacidade mecânica dos animais em manter altas frequências de passada sem uma adaptação prévia. Assim, o aumento do tempo de esforço nestes estágios permitiu atenuar aquele factor de erro, possibilitando a realização de protocolos de esforço até estágios mais avançados de intensidade. Uma outra alteração efectuada diz respeito à inclinação do tapete. No estudo prévio verificámos uma resposta, aparentemente não-linear, do VO_2 em função da velocidade com o aumento da inclinação. Este perfil das rectas foi essencialmente o mesmo obtido por Brooks e White (1978) num teste máximo com inclinação de 20°. Estudos com animais de laboratório e com humanos sugerem a existência de um limiar na intensidade do exercício que leva a uma alteração, qualitativa e quantitativa, do tipo de fibras musculares recrutadas (Saltin, 1973). De acordo com este princípio, uma intensidade aumentada de trabalho resultaria na utilização preferencial de fibras musculares predominantemente glicolíticas na transferência de energia química para mecânica. O recrutamento destas fibras, a um alta carga de trabalho, poderia explicar a resposta não-linear do VO_2 ao incremento da velocidade a uma maior inclinação. Para além disso, é provável que essa quebra na linearidade seja também devida à proximidade de atingimento do VO_{2max}. A partir destes resultados, montámos um protocolo original de teste máximo para avaliar o consumo de oxigénio dos animais e utilizámo-lo durante todo o período de experimento para o controlo do efeito do treino.

Durante todo o experimento, os animais treinados mantiveram valores de VO_2 relativamente à velocidade semelhantes aos encontrados no teste máximo inicial. Por outro lado, os ratos não-treinados foram progressivamente diminuindo tanto a distância desenvolvida como os seus valores de VO_{2max} iniciais. Estes resultados podem ser consequência do processo de aprendizagem dos animais e/ou das adaptações fisiológicas motivadas pelos exercícios físicos agudos repetidos no tempo (Brooks e White, 1978). Dentro destas últimas, é possível que as flutuações de peso possam ter influenciado os valores encontrados, já que se tratam de valores de VO_2 relativo. De facto, os animais treinados apresentaram um menor ganho de peso corporal a partir da quinta semana do protocolo de treino. A mobilização de ácidos gordos dos adipócitos e a utilização destes como fonte de energia no músculo esquelético pode estar subjacente às adaptações fisiológicas com respeito ao indicador ponderal (Saltin e Gollnick, 1983). Por outro lado, os animais não-treinados apresentaram um aumento de 27% a 42% no ganho de peso corporal relativamente ao seu peso inicial. O aumento de peso provavelmente estará relacionado, em ambos os grupos, com o facto dos animais serem ainda jovens – não maturos – aquando do início do experimento. A divergência das curvas, entretanto, deverá ter sido consequência do programa de treino. Os nossos resultados concordam com estudos previamente realizados com animais submetidos a um programa de treino com duração igual ou superior a 8 semanas (Niederhoffer et al, 2000; Wisloff et al, 2001). Para além do cálculo do VO_2 relativo, as flutuações de peso corporal podem também ter influenciado os resultados pelo facto dos animais mais pesados poderem apresentar um menor desempenho devido às limitações decorrentes do excesso de gordura corporal (Taylor et al, 1981; Saltin e Gollnick, 1983).

O teste máximo de VO_2 foi realizado semanalmente por duas razões: 1) para acompanhar o desempenho dos animais treinados e não-treinados num teste máximo e 2) para permitir ajustar a intensidade do esforço durante o protocolo de treino relativo aos valores do VO_{2max} avaliados previamente. Vários estudos relatam a utilização de protocolos de treino, enquadrando-os como leve, moderado

ou intenso (Fry et al, 1992; Gobbato et al, 2001; Chennaoui et al, 2002). Entretanto, ocorre uma grande dificuldade em comparar os estudos que relatam a resposta de sistemas fisiológicos altamente sensíveis (neuroendócrino e imune, por exemplo) ao tipo, intensidade, duração e frequência do exercício. A grande diversidade de protocolos utilizados por estes estudos e a falta da avaliação de uma variável fisiológica durante as sessões de treino podem justificar a disparidade dos resultados. No nosso estudo, avaliamos o VO_2 dos animais durante as sessões de treino. Os valores encontrados do VO_2 estiveram entre 58 – 70% do VO_{2max} avaliado na semana que antecedia a de treino, podendo o esforço, realizado pelos animais, ser classificado como de intensidade moderada.

Apesar de não ter ocorrido qualquer aumento nos valores do VO_{2max} relativo ao longo das semanas de treino, utilizámos, a actividade da enzima citrato sintetase, no músculo soleus, para avaliação das hipotéticas repercussões crónicas que o treino efectuado poderá ter tido, ao nível do metabolismo oxidativo, nos músculos recrutados (Siu et al, 2003). De facto, sendo a citrato sintetase uma enzima limitante para a produção de energia na mitocôndria, ela é frequentemente utilizada como um importante marcador metabólico na avaliação da capacidade respiratória e oxidativa tecidual (Moraska et al, 2000) e os nossos resultados corroboram o efeito bem conhecido do treino físico no metabolismo oxidativo muscular (Pereira et al, 1992; Lancha et al, 1995; Moraska et al, 2000; Niederhoffer et al, 2000; Siu et al, 2003).

Efeito do treino físico moderado

O exercício físico pode provocar alterações transitórias e persistentes nos sistemas fisiológicos, dependentes da intensidade, duração, frequência e tipo de esforço realizado (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Os sistemas neuro-endócrino e imunológico são particularmente sensíveis a uma carga aguda de exercício físico, sendo verificado um aumento plasmático de neurotransmissores, hormonas e citocinas. É interessante observar que em resposta ao treino moderado, o aumento plasmático das hormonas libertadas em resposta a uma

carga aguda de exercício físico parece ser atenuado (Duclos et al, 2001). No presente estudo, verificámos que, nos animais treinados, os níveis plasmáticos de corticosterona não se alteraram 24 horas após a última sessão de treino, o que está de acordo com estudos prévios realizados, quer com animais, quer com humanos. De facto, Chennaoui et al (2002) verificaram em ratos, submetidos a treino moderado durante 6 semanas, que os níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona não foram afectados 24 horas após a última sessão de exercício. Também Duclos et al (2001) verificaram que logo após um exercício agudo e 24 horas depois, os níveis fisiológicos de cortisol não aumentaram em homens treinados quando comparados aos seus pares sedentários. Estas e outras evidências apontam para o facto da activação repetida do eixo HPA, tal como ocorre no exercício efectuado de forma regular, poder levar a uma adaptação na sua resposta a situações de agressão orgânica aguda. Mais especificamente, parece ocorrer uma menor sensibilidade adrenal ao ACTH (Luger et al, 1987; Aguilera, 1994). Tal hipótese vem sendo mantida com os resultados de Inder et al (1995) e Duclos et al (2003), onde o aumento dos níveis basais de ACTH não foi acompanhado pelo aumento de cortisol em homens treinados, comparativamente aos seus pares sedentários. Algumas horas após a aplicação de uma carga aguda de exercício físico, será de esperar um direccionamento do perfil hormonal vocacionado para a estimulação dos processos anabólicos teciduais (Luger et al, 1987). Dada a acção antagonista dos glucocorticóides neste processo nos músculos esqueléticos, a hipótese de que o treino físico pode desenvolver mecanismos de tolerância, tais como a diminuída sensibilidade ao cortisol de forma a proteger os músculos da acção desta hormona, parece plausível já que a elevação dos seus níveis plasmáticos está associada ao catabolismo tecidual e, por conseguinte, à falência do processo de reparo de lesões pós-exercício (Inder et al, 1995; Duclos et al, 2001).

No sistema imune, dois mecanismos parecem estar associados à modulação induzida pelo exercício físico regular: a) a alteração nas populações de células imunocompetentes e b) a alteração na função de células

imunocompetentes (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). No presente estudo, avaliámos o perfil leucocitário do sangue e linfocitário de órgãos linfóides, assim como a função de linfócitos e macrófagos 24 horas após o protocolo experimental de treino. Assumimos que as modificações naqueles parâmetros, avaliados com os animais em repouso, são, de facto, o resultado do efeito crónico do treino sobre as componentes do sistema imune. A maioria das alterações agudas ocorridas neste sistema induzidas pelo exercício agudo são transitórias e retornam aos valores basais dentro das 24 horas a seguir ao esforço, com a excepção dos níveis plasmáticos de algumas citocinas, como o TNF-α e a IL-1 (Moldeveanu et al, 2001).

Nos animais treinados não ocorreram alterações adicionais no percentual de leucócitos do sangue, com excepção dos linfócitos TCD4+. A não alteração do número total de leucócitos em resposta ao treino corrobora os estudos de Kim et al (2003) com ratos submetidos ao treino moderado durante 8 semanas no tapete rolante. Lin et al (1993) verificaram que 12 semanas de treino moderado de natação não acarretaram alteração na concentração de células imunes, inclusive de linfócitos TCD4+ e TCD8+. Estas diferentes respostas, observadas por diferentes trabalhos, em algumas sub-populações de linfócitos podem ser explicados, entre outros, pelos diferentes tipos e durações dos exercícios efectuados nos protocolos de treino. Independentemente desse aspecto, julgamos ser importante realçar que o aumento no percentual de linfócitos TCD4+ verificado no presente estudo, e noutros referidos na literatura (Kim et al 2003), pode ajudar a explicar alguns achados clínicos em pacientes HIV positivos. De facto, num estudo efectuado com este tipo de doentes, submetidos a um programa de 10 semanas de exercício físico moderado, foi demonstrado um aumento na habilidade do organismo em combater infecções oportunistas, provavelmente decorrente do aumento da concentração de linfócitos TCD4+ (LaPerriere et al, 1997).

No presente estudo, analisámos a viabilidade dos linfócitos do sangue através da avaliação dos indicadores de apoptose seleccionados. A apoptose tem

um papel importante na embriogénese, morfogénese e regulação do número de células teciduais, mas a indução inapropriada de morte celular pode resultar numa variedade de efeitos patológicos tais como doença de Alzheimer, câncer e doenças auto-imunes crónicas (AIDS e lúpus eritematoso sistémico) [Wyllie et al, 1980]. De acordo com os nossos resultados, os indicadores de apoptose permaneceram inalterados 24 horas após o protocolo de treino realizado. Sabe-se que uma carga aguda de exercício físico, mesmo que moderado, pode induzir apoptose em linfócitos (Hsu et al, 2002). Os mecanismos subjacentes parecem estar relacionados com as alterações hormonais (aumento dos níveis plasmáticos de glucocorticóides e catecolaminas), os níveis de cálcio citosólico e o estado redox celular (Mooren et al, 2002). Por outro lado, o treino, que resulta numa melhoria nos mecanismos de defesa antioxidante, parece proteger as células de lesões que podem levar à sua morte (Mooren et al, 2002). Avula et al (2001) encontraram uma diminuição na apoptose de linfócitos induzida por H_2O_2, e nenhuma alteração na apoptose espontânea de linfócitos de camundongos exercitados durante 10 meses. É também de realçar o efeito antioxidativo e antiapoptótico das HSP, que previnem a lesão do DNA em leucócitos circulantes em resposta ao exercício crónico (Fehrenbach et al, 2000; Avula et al, 2001). Para além das HSP, é sugerido que a proteína Bcl-2 possa ter alguma importância neste efeito protector (Sasson et al, 2002). Embora não tenhamos determinado os níveis de concentração destas proteínas, prévios estudos já o fizeram. Siu et al (2004) verificaram que o treino físico (5dias/semana durante 8 semanas) atenua a extensão da apoptose no músculo cardíaco e esquelético de ratos. Estes autores associaram este resultado ao aumento do conteúdo de Bcl-2, HSP70 e Mn-SOD no miocárdio e soleus dos animais treinados quando comparados aos animais controlo.

Para o estudo das populações circulantes de células imunes é necessário identificar também as várias sub-populações em órgãos linfóides individuais ou em compartimentos através da expressão de moléculas de superfície. O timo é um dos órgãos centrais na encruzilhada dos sistemas neuroendócrino e imunológico

(Stefansky e Engler, 1998). Precursores de linfócitos T migram da medula óssea para o timo onde vão proliferar, sofrer rearranjo gênico, incluindo a expressão de receptor de células T e expressar moléculas de superfície co-receptoras (Stefansky e Engler, 1998). Vários estímulos neuroendócrinos parecem actuar nesta diferenciação (Engler e Stefansky, 2003). No presente estudo, não houve alteração nas sub-populações de linfócitos do timo em resposta a 8 semanas de treino moderado. Este resultado é contrário aos de Ferry et al (1991) que verificaram uma diminuição do percentual de timócitos imaturos (CD4+CD8+) de ratos a seguir 4 semanas de treino moderado. É possível que 4 semanas de treino seja um período demasiado curto para atingimento do estado crónico de "stady-state" induzido pelo treino sobre alguns parâmetros imunes.

A densidade celular do tecido depende do equilíbrio entre a proliferação, morte e migração de células (Stefansky e Englerl, 1998). No timo, a geração de novas células e a eliminação de células não- e auto- reactivas, bem como a exportação de células maduras, são processos que estão essencialmente envolvidos na regulação da homeostase do órgão (Stefansky e Englerl, 1998). No presente estudo, não houve alteração nos indicadores de apoptose e no índice de proliferação de timócitos em resposta ao estímulo com ConA e LPS. Estes resultados corroboram os de Hoffman-Goetz et al (2001). Concordet e Ferry (1993) encontraram um pequeno aumento na proliferação de timócitos de ratos após um treino leve e moderado. Entretanto, a significância clínica dos achados de Concordet e Ferry (1993) ainda não foram estabelecidas.

No baço, as sub-populações de linfócitos T (CD4+ e CD8+) não se alteraram nos animais submetidos ao treino. Estes resultados diferem dos de Ferry et al (1991) e de Hoffman-Goetz et al (1989), mas são consistentes com os de Lin et al (1993). Ferry et al (1991) encontraram um aumento no percentual de linfócitos TCD8+ do baço a seguir 4 semanas de treino de corrida moderada em tapete rolante. Hoffman-Goetz et al (1989) verificaram um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ do baço em murinos treinados em corrida (30 m/min, 8° de inclinação, 30 min/sessão, 5 dias/semana, durante 8 semanas). Tendo em

consideração a diversidade de resultados apresentados pelos diferentes grupos de trabalho, podemos sugerir que a duração dos treinos, o tipo de protocolo e o desenho experimental utilizado podem ter condicionado aqueles resultados.

Ainda no baço, verificámos um aumento no percentual de linfócitos com DNA fragmentado nos animais treinados. Apesar da grande relevância dada à fragmentação inter-nucleossomal na apoptose, isso não significa necessariamente que a célula esteja em apoptose (Baumann et al, 2002). De facto, há casos de apoptose que ocorrem independentemente da fragmentação ordenada do DNA, havendo também casos em que a célula pode reparar o seu DNA sem entrar necessariamente em apoptose (Baumann et al, 2002). Ademais, a ausência de aumento nos demais indicadores avaliados limita qualquer tipo de desfecho sobre o facto observado.

O índice de proliferação de linfócitos do baço não se alterou nos animais treinados. Em contraste, Ferry et al (1991) verificaram um aumento da resposta proliferativa de linfócitos do baço a seguir 4 semanas de treino. Estes autores correlacionaram o aumento desta resposta com o aumento do percentual de linfócitos TCD4+, mais reactivos ao estímulo mitogénico. Vários estudos verificaram que a resposta proliferativa de linfócitos do baço ao exercício agudo (quer moderado quer intenso) é suprimida imediatamente a seguir o esforço (Carraro e Franceschi, 1997; Mars et sl 1998; Hoffman-Goetz et al, 2001). Ferry et al (1991) verificaram que uma única sessão de exercício físico agudo (2 horas de natação) induziu uma diminuição da resposta proliferativa de linfócitos do baço de ratos. Entretanto, cargas sucessivas de exercício físico agudo moderado podem promover uma adaptação destas células, tornando-as menos reactivas a um stressor físico. Bauer et al (2001) verificaram que, em animais contidos diariamente por 30 minutos durante 13 dias, não ocorreu diminuição na proliferação de linfócitos do baço. Estes autores associaram a síntese aumentada de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e o TNF-α no plasma, a uma modulação regional na sensibilidade de células imunes aos glucocorticoides (Bauer et al, 2001). Apesar da utilização de modelos distintos de stress crónico, estes dados podem ser

interessantes no estudo da adaptação de células imunes a um agente stressor. O estudo da expressão de HSPs, com um papel citoprotector em linfócitos do baço em resposta ao stress crónico, poderia dar alguns indícios sobre o mecanismo subjacente à adaptação destas células em resposta ao treino físico.

Nos linfonodos mesentéricos, os animais treinados apresentaram um aumento no percentual de linfócitos TCD4+. Sabe-se que as células TCD4+, nos tecidos linfóides periféricos, recebem sinais pela interacção com complexos peptídicos MHC das células apresentadoras de antigénio (Stefansky e Engler, 1998). Após diferenciação em Th2, os linfócitos TCD4+ interagem com os linfócitos B. Estes, por sua vez, vão actuar na resposta imune humoral sintetizando e secretando imunoglobulinas. A resposta imune humoral aos antigénios protéicos não pode ocorrer até que células TCD4+ auxiliares tenham sido produzidas (Stefansky e Engler, 1998). Assim, o aumento do percentual destas células em resposta ao treino pode ser um indicador de melhoria da resposta imune mediada por linfócitos B. Este resultado é particularmente interessante já que o aumento ou a permanência de níveis normais de IgA são considerados bons indicadores de resistência à infecção viral ou bacteriana pelo tracto respiratório superior (Nieman, 2003).

De forma similar aos demais órgãos linfóides avaliados no presente estudo, o índice de proliferação de linfócitos dos linfonodos mesentéricos não se alterou nos animais treinados. É provável que as adaptações a cargas sucessivas de exercício físico agudo tenham também proporcionado algum mecanismo de adaptação dos linfócitos deste órgão.

No presente estudo, para ambos os estímulos (*E. Coli e Zimosan*), a actividade fagocítica de macrófagos broncoalveolares de ratos treinados não se alterou comparativamente aos animais não treinados. Esses resultados corroboram os de Woods et al (2000) num estudo realizado com macrófagos peritoniais de ratos treinados. Por outro lado, Bacurau et al (2000) verificaram um aumento da actividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos após treino moderado em tapete rolante (8 semanas, 5 dias/semana, 60 min/dia a 60% do

VO_{2max}). Nascimento et al (2004) verificaram um aumento na actividade fagocítica de macrófagos alveolares (estimulados com *S. serevisie*) de animais submetidos à natação (45 min/dia, durante 6 semanas). Estes diferentes resultados encontrados parecem estar relacionados às variáveis experimentais envolvidas nos estudos, particularmente ao protocolo experimental de treino utilizado, ao tipo de célula estudada (macrófagos residentes ou activados), à localização tecidual (macrófagos peritoniais, alveolares ou do baço), ao tipo de estímulo e ao tempo em que os macrófagos permanecem em cultura, expostos à presença de citocinas como o INF-γ (Fehr et al, 1989; Fernadez e De la Fuente, 1999). É também de realçar que os monócitos/macrófagos são células extremamente heterogéneas e suas funções são reguladas por mediadores solúveis, dependendo do seu estado de activação (Kizaki et al, 2000). Nesse sentido, a ausência de aumentos nos níveis plasmáticos de corticosterona nos animais treinados no nosso estudo, vem reforçar a especulação existente na literatura sobre o papel destas hormonas na mediação da função de macrófagos.

De forma geral, o treino físico moderado não parece ter alterado os parâmetros imunes avaliados, mas é provável que algum tipo de protecção imunitária tenha daí emergido. Segundo Nieman (2003), a modulação positiva do exercício físico crónico moderado no sistema imune é apenas percebida quando este sistema é activado. A longo-termo, isso pode ser traduzido em protecção contra infecções sub-clínicas e clínicas, imunodepressão induzida pelo stress e por doenças crónico-degenerativas (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Estudos com animais demonstram que o treino físico pode retardar a progressão de tumores quimicamente induzidos, tumores implantados e tumores espontâneos (Bacurau et al, 2000). O mecanismo subjacente a tais respostas não está estabelecido, mas pode estar relacionado ao aumento do sistema antioxidante em leucócitos e da expressão das HSPs em resposta ao treino (Fehrenbach et al, 2000). A síntese de HSPs pode ser induzidas pelas espécies reactivas de oxigénio, citocinas e pela hipertermia (Niess et al, 1999). Fehrenbach et al (2000)

verificaram que a expressão de HSP27 e HSP70 em leucócitos permanece alta até 24 horas pós-exercício (75-85% do VO_{2max}).

Efeito da contenção aguda

No presente estudo, utilizámos a contenção para indução de stress. Neste modelo, os animais não sentem dor, mas têm a sensação de confinamento (Glavin et al, 1994). Vários estudos têm utilizado a contenção para estudar os efeitos do stress agudo, e demonstraram que este modelo activa mecanismos de regulação homeostática de natureza neuro-endócrina, incluindo o sistema nervoso autónomo e o eixo HPA (Stefanski e Engler, 1998; De Castro et al, 2000; Bauer et al, 2001; Engler e Stefanski, 2003).

No nosso estudo, verificámos que a exposição à contenção resultou num aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, corroborando estudos prévios que utilizaram o mesmo modelo experimental. De Castro et al (2000) verificaram um aumento no nível de corticosterona em ratos após 40 minutos de contenção. Também Bauer et al (2001) encontraram níveis plasmáticos aumentados desta hormona em resposta à contenção por 60 minutos. O aumento do nível plasmático de corticosterona é considerado um indicador biológico da resposta ao stress e da activação do eixo HPA (Herbert e Cohen, 1993; Gaillard, 1994). Contudo, mesmo que as concentrações de glucocorticoides estejam aumentadas, o seu efeito biológico sobre os tecidos-alvo permanece incerto. O cortisol liga-se a proteínas do plasma, nomeadamente a globulina ligante de glucocorticóide (CGB) (Bauer et al, 2001). Dessa forma, os níveis de corticosterona livre do plasma são também modulados pela variação das CBG. Bauer et al (2001) utilizaram a contenção por 60 minutos para indução de stress e verificaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de CGB. Esta diminuição pode levar a um maior acesso da corticosterona livre aos receptores para esta hormona em células imunes do sangue e dos compartimentos linfóides (Bauer et al, 2001).

Os nossos resultados revelaram alterações na dinâmica de células imunes do sangue e na composição celular de órgãos linfóides nos animais sujeitos à

contenção. No sangue, ocorreu uma leucopenia resultante, principalmente, da diminuição de linfócitos totais e de linfócitos TCD4+. Estes resultados corroboram estudos previamente realizados com o mesmo modelo de indução de stress (Stefanski e Engler, 1998; Bauer et al, 2001). A diminuição observada na dinâmica de células está correlacionada com a libertação das hormonas do stress, resultando numa redistribuição de células da circulação para os tecidos (Zwilling, 1991). Como a expressão de β-receptores fornece a base molecular para acção das catecolaminas e os neutrófilos e os linfócitos apresentam um maior número de receptores comparativamente a outras células imunes, é de esperar que sejam mais responsivos (Faure et al, 2004). De facto, no presente estudo, observámos uma neutrofilia, uma monocitose e um aumento no percentual de linfócitos TCD8+. O aumento da expressão de moléculas de adesão integrinas (CD11a) no tecido endotelial e selectinas (CD62L) nos linfócitos induzida pelas catecolaminas parece estar subjacente a tais alterações na concentração de linfócitos circulantes. Apesar de não termos avaliado a concentração plasmática das catecolaminas, a activação do SNS e do eixo HPA em resposta a um stressor agudo induzindo o aumento destas hormonas no plasma já é um fenómeno bem estabelecido (Fleshner et al, 1992).

O aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona verificados no presente estudo parecem também ter relação com a redistribuição de células imunes no sangue. Os glucocorticóides podem aumentar a sensibilidade dos receptores β-adrenérgicos em células NK, linfócitos TCD4+, TCD8+ e neutrófilos, e a síntese de AMPc em células imunes (Wiegers et al, 1993). Além disso, os glucocorticóides parecem prolongar a acção das catecolaminas inibindo a recaptação e diminuição dos níveis periféricos de catecol-o-metiltransferase e da monoamina oxidase, como já foi verificado, por exemplo, na junção neuro-muscular (Bauer et al, 2001).

A diminuição da relação CD4+/CD8+ para valores abaixo de 1,5 é anormal e pode estar associada a estados de imunossupressão (Wiegers et al, 1993). No presente estudo, verificámos uma diminuição na fracção de linfócitos TCD4+ simultaneamente com o aumento de linfócitos TCD8+. Nossos resultados

corroboram os de Feng et al (1991) num estudo com ratos submetidos a 2 horas de imobilização. Em humanos, Ceddia et al (1999) verificaram uma diminuição na relação de linfócitos CD4+/CD8+ do sangue em resposta a um agente stressor físico (exercício agudo a 100% do VO_{2max} até a exaustão). Como o aumento de linfócitos TCD8+, assim como sua activação, parecem estar associados à incidência de doenças virais e auto-imunes (Feng et al, 1991), os nossos resultados sugerem que o stress e a doença possam estar interrelacionados – o primeiro possivelmente pela promoção da "janela aberta" do organismo para o estabelecimento do segundo (Stefanski e Engler, 1998).

A diminuição do percentual de linfócitos da circulação parece também ter resultado do aumento do percentual de células apoptóticas observadas no presente estudo. As células imunes que sofrem lesões irreparáveis são geralmente eliminadas por apoptose (Wyllie et al, 1980). De facto, estudos têm demonstrado que o stress físico causa lesão do DNA de leucócitos circulantes (Niess et al, 1997; Niess et al, 1998), justificando a ocorrência de apoptose nestas células após a aplicação da situação indutora de stress. Por exemplo, Mooren et al (2002), verificaram um aumento do percentual de linfócitos apoptóticos do sangue de ratos em resposta a um stressor físico (exercício físico agudo exaustivo). No nosso trabalho, para a avaliação do percentual de células apoptóticas, utilizámos três indicadores: (i) integridade de membrana celular, (ii) fragmentação do DNA e (iii) integridade de membrana mitocondrial. Alguns estudos tem utilizado a análise da perda da integridade da membrana celular de leucócitos e o aumento do percentual de leucócitos com DNA fragmentado em animais submetidos a um stressor (Concordet e Ferry, 1993; Niess et al, 1998; Hoffman-Goetz e Zajchowski, 1999). Contudo, um dos meios mais utilizados para o estudo da morte celular por apoptose é a manutenção da integridade mitocôndrial (Kroemer et al, 1998). As mitocôndrias conseguem manter, sob condições fisiológicas, uma diferença de potencial através de sua membrana interna, entre o ambiente da matriz e o espaço inter-membranar (Wyllie et al, 1980). A indução de apoptose parece estar associada a uma alteração nesta diferença de potencial a qual resulta de um

aumento na permeabilidade da membrana interna, acarretando fuga de cálcio, glutationa e proteínas de baixo peso molecular da matriz mitocondrial (Kroemer et al, 1998). Este aumento de permeabilidade da membrana interna motiva o desacoplamento da fosforilação oxidativa, com a consequente redução na taxa de fosforilação do ADP e, simultaneamente, aumento na produção de radical superóxido e queda na biossíntese mitocondrial (Kroemer et al, 1998). No presente estudo, verificámos que ocorreu um aumento no percentual de linfócitos do sangue com perda de integridade da membrana mitocondrial após a contenção aguda. Os mecanismos subjacentes podem estar relacionados com o aumento da corticosterona e do TNF-α circulante em resposta à situação indutora de stress. Os glucocorticóides parecem induzir o aumento da expressão da proteína p53 e do AMPc, que estão entre os indutores de apoptose mais comuns (Sasson et al 2001). O efeito modulador do TNF-α solúvel, pode ser feito via receptores tipo I de TNF-α, que contém um domínio de morte citoplasmático envolvido no sinal de transdução e apoptose (Sasson et al 2001). O aumento do percentual de leucócitos apoptóticos pode causar linfopenia, imunodeficiência, maior incidência de infecções oportunistas e aumento da sensibilidade a alergénios, as quais constituem alterações estruturais, funcionais e bioquímicas comuns após situações de stress (Kroemer et al, 1998).

Em órgãos linfóides, a contenção provocou alterações nas sub-populações de linfócitos. No timo, houve uma diminuição no percentual de linfócitos T corticais (CD4+CD8+). Stefansky e Engler (1998) encontraram o mesmo resultado em animais submetidos a um stressor psicológico e social, e Hoffman-Goetz et al (1989) registaram as mesmas observações em animais fisicamente stressados. Estes autores associaram aquelas alterações ao aumento dos níveis de corticosterona circulante. A imunorregulação dos glucocorticóides é mediada pelos receptores de glucocorticóides (GR), os quais são expressos em todos os leucócitos (Bauer, 2001). Os dois tipos de GR (tipo I e tipo II) variam em sua afinidade para a corticosterona, com o tipo II tendo entre 6 e 10 vezes menos afinidade do que o tipo I (Ashwell et al, 2000). O GR tipo I não é detectável no

timo, enquanto que os GRs do tipo II são encontrados no timo, baço e linfonodos (Ashwell et al, 2000). A presença destes receptores indicam que o sistema imune é sensível a activação do eixo HPA e a elevação da corticosterona na circulação (Ashwell et al, 2000). De facto, tem sido demonstrado que após exposição à contenção por 1 hora, existe uma ocupação significativa dos receptores do tipo I no baço e do tipo II no timo e linfonodos (Spencer et al, 1991; Stefansky e Engler, 1998). Os linfócitos T imaturos duplamente marcados (CD4+CD8+) são particularmente sensíveis à presença dos glucocorticóides (Ashwell et al, 2000). A diminuição de linfócitos TCD4+CD8+ pode estar associado a uma falha no processo de desenvolvimento dos timócitos maduros unipositivos CD4+ ou CD8+, sendo estas células, após maturação, exportadas do timo para se juntarem ao *pool* de células periféricas (Ashwell et al, 2000). Assim, podemos sugerir que a diminuição de linfócitos TCD4+ na circulação observada nos animais submetidos à contenção pode ter decorrido também de uma menor produção destas células no timo.

O presente estudo revelou que, nos animais submetidos à contenção, ocorreu um aumento nos eventos apoptóticos e uma diminuição na resposta proliferativa de timócitos. Estes dados são consistentes com a ideia de que a resposta proliferativa e a morte celular programada utilizam a mesma via de activação, sugerindo uma regulação concomitante deste processo via glucocorticóides e citocinas (Grassilli et al, 1992). Os glucocorticóides parecem participar do controlo da proliferação celular através da regulação de diversos genes ligados ao crescimento e à diferenciação celular, tendendo a promover a diferenciação e a inibir a proliferação (Grassilli et al, 1992).

Alguns estudos verificaram que em resposta a um agente stressor (de origem psicológica), há uma diminuição da proliferação induzida por mitógeno em linfócitos do baço (Rabin et al, 1990; Backmet, 2004). Em contraste, encontrámos no nosso estudo um aumento na resposta proliferativa dos linfócitos do baço de animais submetidos à contenção. Da mesma forma, Bauer et al (2001) encontraram um aumento na proliferação de linfócitos do baço em animais

contidos por 60 minutos. É possível que níveis aumentados de hormonas do stress possam estar subjacentes a tais respostas. Lysle et al (1990) verificaram um aumento na expressão de receptores para a IL-2 em linfócitos do baço em resposta ao aumento dos níveis de corticosterona plasmática, situação que poderá ter implicações biológicas importantes. De facto, o baço está primariamente envolvido na exterminação de antigénios independentes de linfócitos T, tais como as bactérias encapsuladas, ao passo que os linfonodos são responsáveis por activar a resposta imune à infecções nos tecidos (Spencer et al, 1991). Assim, a activação da função de linfócitos do baço induzida pelo stress pode alterar a protecção contra patógenos provenientes da circulação. Todavia, torna-se necessário avaliar qual o tipo de população de linfócitos que está sendo alterada (células de memória ou células virgens).

Nos linfonodos mesentéricos, verificámos uma diminuição de linfócitos TCD4+ e um aumento no percentual de linfócitos TCD8+. Estes resultados parecem representar um dado biológico importante no que respeita à resposta imune mediada por linfócitos (Spencer et al, 1991). Uma menor produção de imunoglobulinas por linfócitos B, que comummente ocorre em reposta a um agente stressor, pode decorrer de um aumento do percentual de linfócitos TCD8+ supressores em órgãos linfóides secundários (Spencer et al, 1991). Quando activados por células apresentadoras de antigénio, os linfócitos TCD8+ actuam inibindo os linfócitos B a produzirem anticorpos (Spencer et al, 1991). Assim, a incidência de infecções do tracto respiratório superior após a exposição a um agente stressor pode decorrer também de alterações no processo de diferenciação de células efectoras nos linfonodos (Nieman et al, 2000). Ademais, é sempre importante considerar a natureza integrada do sistema imune e como as alterações funcionais de um componente podem influenciar um outro componente.

No presente estudo, verificámos uma diminuição na actividade fagocítica dos macrófagos alveolares. Para ambos os estímulos utilizados neste estudo (Zimosan e *Escherichia Coli*) a contenção parece ter suprimido a resposta fagocítica dos macrófagos. Estes resultados corroboram os de Moinard et al

(1999) que verificaram uma diminuição da actividade fagocítica de macrófagos peritoniais de ratos fisicamente stressados em resposta a estímulo com Zimosan. Também Nascimento et al (2004) observaram uma diminuição da actividade fagocítica de macrófagos alveolares em resposta a estímulo com *S. cerevisie* nos animais contidos por 40 minutos, tendo atribuído esta diminuição à presença de níveis elevados de corticosterona. De facto, o mecanismo subjacente pode estar relacionado com a presença aumentada destas hormonas e com a sua acção inibidora na expressão de receptores Fc em macrófagos (Fehr et al, 1989). A diminuição da actividade fagocítica de macrófagos tanto pode comprometer o mecanismo de defesa inato, como a sequência de eventos da resposta imune adaptativa à infecção (Zwilling e Hillburger, 1994). A eficiência dos fagócitos parece ter uma profunda influência no aumento ou supressão da inflamação, e se há problemas na remoção e reparo dos tecidos no processo inflamatório, a autoimunidade ou o câncer podem advir (Zwilling e Hillburger, 1994; Woods et al, 2000).

O presente estudo fortalece as evidências dos efeitos imunossupressores do stress motivado por factores psicológicos em animais de laboratório. Estes efeitos foram verificados tanto relativamente à concentração de células imunes como às suas funções. Se estas alterações são transitórias, simplesmente reflexo de uma automodulação das células imunes em busca da homeostase, ou se são permanentes, comprometendo desta forma a actuação das componentes do sistema imune, é um assunto que necessita de ser considerado. Todavia, é bem provável que, mesmo de natureza transitória, estas alterações tenham consequências fisiopatológicas importantes e mereçam ser consideradas na etiologia de algumas doenças, como por exemplo, o câncer.

Efeito do treino físico moderado em ratos stressados

O presente estudo evidenciou que o treino moderado, ainda que sem promover, por si só, qualquer alteração aparente na dinâmica e função dos parâmetros imunes avaliados, evitou as alterações induzidas por um agente

stressor de origem psicológica. Este fenómeno, conhecido como tolerância cruzada, permite, por aplicação de forma continuada de um estímulo (neste caso o treino físico), uma atenuação da amplitude das alterações orgânicas (tolerância) em resposta à aplicação aguda de outros diferentes estímulos agressores/indutores de stress (Foyer et al, 1997). Neste sentido, o nosso estudo fortalece a ideia de que os seres vivos fazem uso de vias e componentes comuns na relação estímulo/resposta a diferentes agentes indutores de stress (Pastori e Foyer, 2002).

Com o objectivo de se ter um indicador biológico de activação do eixo HPA perante um agente stressor, avaliámos os níveis plasmáticos da corticosterona. Nos animais treinados e stressados, não ocorreu aumento nos níveis plasmáticos dessa hormona, contrariamente ao observado nos animais não-treinados e stressados. Também Kizaki et al (2000) não verificaram nenhum aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona de animais treinados (natação durante 6 semanas, 5 dias/semana, 90 min/dia) e posteriormente expostos ao stress térmico (5° C durante 3 horas) quando comparados aos seus pares somente stressados. Como referido anteriormente, a estimulação repetida do eixo HPA parece promover uma menor sensibilidade da camada cortical das glândulas supra-renais ao aumento de ACTH. Assim, é possível que esta aparente adaptação crónica do eixo HPA motivada pelo treino físico, se possa estender a outros agentes stressores, hipótese esta que deverá ser testada em estudos futuros. Contudo, em contraste ao presente estudo, Chennaoui et al (2002) verificaram um aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e de corticosterona em animais treinados (60 min/dia, 5 dias/semana, durante 7 semanas) e stressados (40 minutos de contenção). Aspectos de carácter metodológico, tais como as características dos protocolos de treino e de indução de stress implementados, assim como as técnicas de análise bioquímica e os tempos que medeiam entre o final do programa de treino e o sacrifício dos animais, poderão justificar os diferentes resultados encontrados por outros grupos de investigação.

Poderia ser sugerida a utilização de glucocorticóides sintéticos, como a prednisolona ou a dexametasona, para avaliação do efeito do treino em parâmetros imunes. Dessa forma, poder-se-ia verificar como os animais treinados responderiam a uma alta concentração daqueles corticosteróides. Contudo, optámos por não utilizar essa metodologia uma vez que as alterações imunes não devem ser limitadas aos altos níveis de glucocorticóides, pois outras substâncias, como as citocinas, podem mediar a resposta imune e também porque as substâncias sintéticas podem não ser bons substitutos para actuação fisiológica dos glucocorticóides, apesar da sua utilidade em estudos clínicos e experimentais (Blalock, 1994). Nesse sentido, a dexametasona, por exemplo, não se liga a receptores para mineralcorticóides, e pode interagir com os receptores dos glucocorticóides com cinéticas ou afinidades diferentes da corticosterona natural (Funder, 1993; Sapolsky et al, 2000).

No presente estudo, os animais stressados apresentaram um aumento do percentual de linfócitos apoptóticos no sangue e em órgãos linfóides, comparativamente aos ratos treinados e stressados. A apoptose de linfócitos circulantes é principalmente induzida pelo aumento de glucocorticóides circulantes, apesar de outras substâncias do plasma poderem também contribuir para a sua indução (Lee et al, 2001). A morte da célula pode ser induzida via receptores de superfície celular Fas e ligante Fas (FasL) ou por citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6) (Lee et al, 2001). Ferenbarch e Northoff (2001) documentaram um aumento da expressão do FasL, após um agente stressor físico agudo, indicando um maior potencial apoptótico de leucócitos. Por outro lado, em resposta ao treino, há uma diminuição dos indutores solúveis de apoptose: o FasL, o receptor Fas e o sFasL, uma citocina que induz apoptose quando se liga ao receptor Fas de membrana activando as caspases (Sata et al, 1998). Adamopoulos et al (2002) verificaram uma diminuição na expressão de Fas e FasL a seguir um exercício leve (>50% do VO_{2max}) e moderado (60-70% do VO_{2max}). Os autores concluíram que o treino físico reduz o sistema Fas/FasL, e, por essa razão, tende a atenuar a apoptose. O treino físico parece também causar

uma diminuição significativa na produção de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores solúveis (TNF-RI, TNF-RII e IL-6R) que são produtos da interacção de células endoteliais com monócitos e, simultaneamente, moduladores biológicos da acção de citocinas circulantes (Adamopoulos et al, 2002). Assim sendo, o treino moderado pode melhorar a tolerância de leucócitos à lesão induzida pelo stress por contenção.

Além da via mediada pelo Fas, a morte celular pode também ser induzida via stress oxidativo mitocondrial (Mooren et al, 2004). Alterações no potencial transmembrânico mitocondrial (PTM) são seguidas de extravasamento de proteínas do espaço intermembranar, como o citocromo c e o factor de activação de apoptose 1 (Apaf-1) (Ueda et al, 2002). Estas moléculas desencadeiam a apoptose ou pela activação das caspases ou pela condensação directa da cromatina independente de caspases (Ueda et al, 2002). Os sinais iniciais envolvem um aumento na concentração de cálcio intracelular e/ou a formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e nitrogénio (ERN) (Baumann et al, 2002). Para prevenir as lesões resultantes deste stress oxidativo ou nitrosilativo, a célula está equipada com diferentes mecanismos de defesa. De facto, substâncias antioxidantes como glutationa, ou enzimas como a superóxido dismutase, glutationa peroxidase e glutationa redutase, parecem ter um importante papel nessa protecção (Niess et al, 1999). Vários estudos indicam que o treino regular está associado ao aumento dos mecanismos de protecção celular contra as espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio (Ueda et al, 2002; Radak et al, 2003). Portanto, a tolerância de leucócitos a um agente stressor pode estar também associada a uma redução da taxa de sintese de ERO e ERN e/ou a um aumento da eficácia dos mecanismos antioxidantes destas células (Niess et al, 1999).

A lesão do DNA pode levar ou à reparação do DNA lesado ou à indução da apoptose como mecanismo de defesa celular (Baumann et al, 2002). Recentemente, Tsai et al (2001) demonstraram que um agente stressor, a depender de sua magnitude, é habitualmente seguido pelo aumento dos níveis de fragmentação de DNA. Os nossos resultados demonstram que a contenção

provocou um aumento no percentual de linfócitos com fragmentação do seu DNA, quer no sangue, quer em órgãos linfóides. Por outro lado, os animais treinados e sujeitos à contenção não apresentaram qualquer alteração neste percentual. Estes resultados estão de acordo com outros que sugerem que a instabilidade genómica após o stress parece ser menos pronunciada em ratos treinados (Niess et al, 1999; Ueda et al, 2002). Da mesma forma, em homens treinados e submetidos a uma maratona, houve também uma diminuição do percentual de linfócitos apoptóticos do sangue quando comparados a sujeitos destreinados e submetidos ao mesmo esforço intenso (Miyazaki et al, 2001).

A p53 parece actuar como um factor de transcrição induzido pela situação de stress e possuir um papel importante na activação e integração de uma grande quantidade de respostas celulares adaptativas para uma amplitude de agentes stressores ambientais (Fridman et al, 2003). Dependendo do tipo e da severidade do stress celular, a p53 pode estar associada ou não a indução da apoptose (Fridman et al, 2003). Por exemplo, especificamente a apoptose induzida por radiação, parece ser dependente da p53 (Fridman et al, 2003). Os níveis da p53 são dramaticamente aumentados após a exposição à radiação x, radiação iônica, hipóxia e outros stressores que podem levar a uma massiva apoptose nas células alvo (Bode et al, 1997). Entretanto, a apoptose em resposta ao aumento dos níveis de glucocorticóides parece ser independente da p53 (Lee et al, 2001). Em células granulosas humanas, os glucocorticóides parecem protegê-las da apoptose, provavelmente aumentando os níveis de Bcl-2 nestas células (Sasson et al, 2001). É inclusivamente possível, que ocorra uma resposta cruzada entre a acção do TNF-α e dos glucocorticóides na modulação da apoptose, via controlo dos níveis celulares de Bcl-2 (Huang e Cidlowski, 1999; Crochemore et al, 2002).

No presente estudo, verificámos que a exposição à situação de contenção induziu um aumento da resposta proliferativa e da fragmentação de DNA de linfócitos do baço. Nos animais treinados e stressados, estes valores foram normalizados. Os níveis de Bcl-2 em linfócitos podem alterar o efeito pró-apoptótico dos glucocorticóides para um efeito anti-apoptótico quando estes são

expostos a um stressor (Amsterdan et al, 2002). Os glucocorticoides podem também impedir a sinalização da p53 na indução da apoptose e, com isso, prevenir a lesão excessiva de células após diferentes tipos de stress implicados no aumento da expressão da p53 (Lee et al, 2001). Já no timo, os nossos dados demonstram que o stress provocou um aumento de linfócitos apoptóticos e uma diminuição da resposta linfoproliferativa. Nos animais treinados e submetidos à contenção, não verificamos tais resultados. Em células tímicas, o treino parece atenuar o percentual de linfócitos apoptóticos (Concordet e Ferry, 1993). É provável que as adaptações ocorridas decorram do aumento da IL-2, a qual, por sua vez, aumenta os níveis de mRNA da Bcl-2 (Siu et al, 2004).

É interessante considerar que existe uma interacção da p53 e do receptor de glucocorticóides (RG) sob condições fisiológicas (Sasson et al, 2001). Ambos, p53 e RG, são mediadores da resposta ao stress, mas há diferenças intrínsecas em suas acções (Sasson et al, 2002). O RG, quando complexado aos glucocorticóides, está envolvido na resposta de lutar-ou-fugir, e mantém a homeostase durante as alterações internas ou ambientais (Sapolsky et al, 2000). Portanto, o RG, é geralmente envolvido na resposta à sobrevivência (Sapolsky et al, 2000). Por outro lado, a p53, que tem sido descrita como uma guardiã do genoma, responde a uma grande variedade de stressores genómicos, induzindo a morte celular (Achanta e Huang, 2004). A hipóxia e a lesão do DNA representam uma situação onde a p53 e o RG têm efeitos opostos (Huang e Cidlowski, 1999). A resposta de morte, via p53, é parada quando o ligante activado pela RG é accionado, ocorrendo então a degradação da p53 (Sasson et al, 2001). O GR é também inibido pelo aumento da sinalização de morte induzida pela p53 (Huang e Cidlowski, 1999; Sasson et al, 2001). A interacção entre estes factores parece funcionar como um balanço das respostas celulares para sinais conflitantes.

Adicionalmente, parece-nos importante realçar a possível contribuição das proteínas HSPs principalmente na reparação das proteínas danificadas em resposta ao stress (Siu et al, 2004). A indução da HSP70 parece proteger as células tímicas da apoptose induzida pelo stress através da redução da expressão

das proteínas p53 e Bax (Mosser et al, 1993). A indução da HSP70 pode, assim, representar um importante mecanismo através do qual os efeitos imunossupressores associados ao stress podem ser minimizados (Mosser et al, 1993). De facto, como seria de esperar, o treino físico moderado (70% do VO_{2max}) ou intenso (>80% VO_{2max}) parece aumentar a expressão das proteínas HSP70 e HSP90 em leucócitos (Fehrenbach et al, 2000).

No presente estudo, a situação de contenção induziu uma diminuição na actividade fagocítica de macrófagos. Contudo, os animais que foram submetidos ao protocolo experimental de treino e ao stressor não apresentaram qualquer alteração nesta funcionalidade. Estes resultados corroboram com os de Nascimento et al (2004) resultantes de um estudo efectuado com ratos nadadores e stressados. Segundo Woods et al (1999), os macrófagos são células particularmente sensíveis a cargas sucessivas de exercício. Os mecanismos subjacentes a tais adaptações são desconhecidos, mas podem estar relacionados a factores neuro-endócrinos. Itoh et al (2004) verificaram em camundongos treinados por 3 semanas em tapete rolante (18 m/min, 30 min/dia, e 5 dias/semana) uma diminuição da expressão de receptores β_2-adrenérgicos em macrófagos peritoniais. Os resultados de Itoh et al (2004) sugerem que o treino induziu uma diminuição do efeito supressivo das catecolaminas em macrófagos.

Assim, as alterações homeostáticas em resposta a situações agressivas parecem ser atenuadas pela aplicação de um treino físico prévio. As células do sistema imune parecem apresentar mecanismos adaptativos que permitem a melhoria da sua funcionalidade em resposta ao exercício físico regular e de intensidade moderada.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÕES

O treino físico de intensidade moderada, por si só, não alterou a contagem total e diferencial de células imunes da circulação, o arranjo de leucócitos em compartimentos imunes, os indicadores de apoptose de linfócitos do sangue e de órgãos linfóides, a função proliferativa de linfócitos de órgãos linfóides e a função fagocítica de macrófagos.

A situação de contenção promoveu um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona, a qual se associou a leucopenia, linfopenia, monocitose e neutrofilia. A exposição à situação de contenção também induziu uma diminuição da relação de linfócitos TCD4+/CD8+ do sangue, afectou a concentração, a viabilidade e a função de linfócitos do sangue e de órgãos linfóides e, ainda, diminuiu a função de macrófagos do aspirado bronco-alveolar. Estas alterações, no seu conjunto, são sugestivas de um estado de imunossupressão.

Nos animais treinados e submetidos posteriormente à situação de contenção, comparativamente aos não treinados e stressados, a amplitude de variação dos parâmetros imunológicos estudados foi significativamente atenuada. As evidências aqui disponíveis sugerem que o treino moderado tenha efeitos moduladores importantes na dinâmica e na função de células imunes quando o organismo é sujeito à acção de outros estímulos agressores. Estes dados sugerem fortemente que o treino físico induziu tolerância cruzada, ao nível da resposta do sistema imune, atenuando significativamente a intensidade das respostas orgânicas agudas à situação de contenção.

PERSPECTIVAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS

8. PERSPECTIVAS PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS

O presente estudo suscitou o interesse para outras investigações futuras nas quais, em animais treinados, seja possível avaliar aspectos da resposta imune a outras condições fisiopatológicas, agudas ou crónicas, tais como: i) a endotoxemia, ii) a implantação de tumores, iii) a diabetes melittus, iv) a desnutrição no período de aleitamento e v) o envelhecimento.

No que respeita aos hipotéticos mecanismos responsáveis pela tolerância do sistema imune a estímulos repetidos, os seguintes parâmetros devem ser tidos em consideração nessas investigações futuras:

1) Sub-populações de linfócitos TCD4+ e CD8+ (memória ou virgens) do sangue e de órgãos linfóides.

2) Níveis plasmáticos de citocinas como o TNF-α e a IL-6.

3) Expressão de receptores para glucocorticóides em linfócitos e macrófagos.

4) Expressão das proteínas p53 e Bcl-2 em linfócitos e monócitos/macrófagos.

5) Expressão das proteínas HSP70 e HSP90 em leucócitos

6) A regulação da geração de ERO/ERN em células imunocompetentes em resposta ao exercício agudo e ao treino regular;

7) Os efeitos imuno-moduladores de ERO/ERN que inclui activação de factores de transcripção;

8) O efeito dos antioxidantes induzidos pelo exercício na função imune.

BIBLIOGRAFIA

9. BIBLIOGRAFIA

1. Achanta, G.; Huang, P. (2004). Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Res*, 64(17):6233-6239.
2. Adamopoulos, S.; Parissis, J.; Karatzas, D.; Kroupis, C.; Georgiadis, M.; Karavolias, G.; Paraskevaidis, J.; Koniavitou, K.; Coats, A.J.S.; Kremastinos, D. (2002). Physical Training Modulates Proinflammatory Cytokines and the Soluble Fas/Soluble Fas Ligand System in Patients With Chronic Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*, 32(4): 653-663.
3. Adams, D.O.; Hamilton, T.A. (1992). Molecular basis of macrophage activation: diversity and its origins. In: CE Lewis, JO'D McGee (Eds). The natural immune system volume II: the macrophage (pp.75-114). Oxford University Press, Oxford.
4. Aguilera, G. (1994). Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*, 15(4): 321 - 350.
5. Alp, P.R.; Newsholme, E.A.; Zammit, V.A. (1976). Activities of citrate synthase, NAD +-linked, e NADP +-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochemical J*, 154(3): 689-700.
6. Ambrose, C.T. (1970). The essential role of corticosteroids in the induction of the immune response *in vitro*. In: GEW Wolstenholme e J Knights (Eds). Hormones and the Immune Response (pp.100–125). Churchill, London. CIBA Foundation Study Group.
7. Amsterdam, A.; Sasson, R. (2002). The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*, 189(1-2): 1–9.
8. Angelopoulos, T.J. (2001). Beta-endorphin immunoreactivity during high-intensity exercise with and without opiate blockade. *Eur J Appl Physiol*, 86(1): 92-96.
9. Ardawi, M.S.M.; Newsholme, E.A. (1983). Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochemical J*, 212(3): 835-842.
10. Ascensão, A.; Magalhães, J.; Soares, J.; Oliveira J.; Duarte, J.A. (2003). Exercise and Cardiac Oxidative Stress. *Rev Port Cardiol*, 22(5): 651-678.
11. Ashwell, J.D.; Lu, F.W.M.; Vaxxhio, M.S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol*, 18, 309-345.
12. Atanackovic, D.; Kroger, H.; Serke, S.; Deter, H.C. (2004). Immune parameters in patients with anxiety or depression during psychotherapy. *J Affect Disord*, 81(3): 201-209.
13. Avula, C.; Muthukumar, A; Zaman, K., McCarter, R., Fernandes, G. (2001). Inhibitory effects of voluntary Wheel exercise on apoptosis in splanic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *J Appl Physiol*. 91(4): 2546-2552.

14. Bacurau, R.F.P.; Belmonte, M.A.; Seelaender, M.C.L.; Costa Rosa, L.P. (2000). Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct*, 18(4): 249-258.
15. Bakhmet, A.A. (2004). Lymphoid structure of the spleen in rats exposed to acute emotional stress. *Morfolog.* 125(1):55-58.
16. Baj, Z.; Kantorski, J.; Makewska, E.; Zeman, K.; Pokoca, L.; Fornalczyk, E.; Tchorzewski, H.; Sulowska, Z.; Lewicki, R. (1994). Immunological status of competitive cyclists before and after the training season. *Int J Sports Med*, 15(6): 319-324.
17. Bauer, M.E.; Perks, P.; Lightman, S.L.; Shanks, N. (2001). Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunregulation. *Physiol Behav*. 73: 525-532.
18. Baum, M.; Liesen, H.; Enneper, J. (1994). Leucocytes, lymphocytes, activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. *Int J Sports Med*, 15 (Suppl 3):122-126.
19. Baumann, S.; Krueger, A.; Kirchhoff, S.; Krammer, P.H. (2002). Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med*, 2(3):257–272.
20. Bedford, T.G.; Tipton, C.M.; Wilson, N.C.; Oppliger, R.A.; Gisolfi, C.V. (1979). Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl Physiol: Respirat. Environ. Exerc Physiol*, 47 (6): 1278–1283.
21. Berczi, I. (1998). The stress concept and neuroimmunorregulation in modern biology. *Ann N Y Acad Sci*, 30(851):3-12.
22. Bermudez, L.E.; Wu, M.; Young, L.S. (1990). Effect of stress related hormones on macrophage receptors and response to tumor necrosis factor. *Lymphokine Res*, 9(2):137-145.
23. Besedovsky, H.O.; Del Rey, A.; Sorkin, E. (1985). Immunoneuroendocrine interactions. *J Immunology*, 135(Suppl. 2):750-754.
24. Besedovsky, H.O.; Del Rey, A.; Sorkin, E.; Dinarello, C.A. (1986). Immunoregulatory feedback between interleukina-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, 223: 625-654
25. Blalock, J.E. (1994). The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today*, 15(11): 504-511.
26. Blannin, A.K.; Robson, P.J.; Walsh, N.P.; Clark, A.M.; Glennon, L.; Gleeson M. (1998). The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *Int J Sports Med*, 19(8): 547-552.

27. Blatteis, C.M. (1992). Role of the OVLT in the febrile response to circulating pyrogens. *Prog. Brain Res,* 91:409-412.

28. Bode, U.; Wonigeit, K.; Pabst, R.; Westermann, J. (1997). The fate of activated T cells migrating through the body: rescue from apoptosis in the tissue of origin. *Eur J Immunol.* 27(8):2087-2093.

29. Boscolo, P.; Di Gioacchino, M.; Qiao, N.; Sabbioni, E. (2004). Work, environment, immune system and human health. *Int J Immunopathol Pharmacol,* 17(Suppl. 2):1-2.

30. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem,* 72(7): 248-254.

31. Brenner, I.K.; Natale, V.M.; Vasiliou, P.; Moldoveanu, A.I.; Shek, P.N.; Shephard, R.J. (1999). Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol,* 80(5):452-460.

32. Brenner, I.K.; Shek, P.N.; Zamecnik, J.; Shephard, R.J. (1998). Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med,* 10(5): 130-143.

33. Brooks, G.A.; White, T.P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol: Respirat Environ Exerc Physiol,* 45(6): 1009–1015.

34. Bury, T.; Marechal, R., Mahieu, P.; Pirnay, F. (1998). Immunological status of competitive football players during the training season. *Int J Sports Med,* 19(5):364-368.

35. Calder, P.C.; Yaqoob, P. (1999). Glutamine and the immune system. *Amino Acids,* 17(3): 227-241.

36. Carraro, U.; Franceschi, C. (1997). Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise *Aging (Milano)*: 9(1-2):19-34.

37. Ceddia, M.; Price, E.; Kohlmeier, C.; Evans, J.; Lu, Q.; McAuley, E.; Woods, J. (1999). Differential leukocytosis and Lymphocyte mitogenic response to acute maximal exercise on the Young and old. *Med Sci Sports Exerc.* 31 (6):829-836.

38. Cheetham, K.M.; Shulka, N; Fuller, B.J. (1998). In: Cell Separation – a practical approach (ed. D. Fisher, G.E. Francis and D. Rickwood). P.1. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

39. Chennaoui, M.; Merino, G.D.; Lesage, J., Drogou, C., Guezennec, C.Y. (2002). Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand.* 175(2):113-121.

40. Concordet, J.P.; Ferry, A. (1993). Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). *Am J Physiol*, 265(34): C626-C629.

41. Crochemore, C.; Michaelidis, T.M.; Fischer, D.; Loeffler, J.P.; Almeida, O, (2002). Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. *FASEB J*, 16(8): 761–770.

42. Cupps, T.R.; Gerrard, T.L.; Falkoff, R.J.M.; Whalen, G.; Fauci, A.S. (1985). Effects of *in vitro* corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Clin Invest*, 75(2):754–761.

43. Currie, R.W.; Tanguay, R.M.; Kingma, J.G. (1993). Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation*. 87(3):963-971.

44. Davis, J.M.; Kohut, M.L.; Jackson, D.A.; Colbert, L.H.; Mayer, E.P.; Ghaffar, A. (1998). Exercise effects on lung tumor metastases and *in vitro* alveolar macrophage antitumor cytotoxicity. *Am J Physiol*, 43(5pt2):R1454-R1459.

45. De Castro, C.B.; Manhães-de-Castro, R.; Medeiros, AF.; Queirós. A; Ferreira, W.T., Lima Filho, J.L. (2000) Effect of stress on the production of O_2^- in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 108 (1): 68-72

46. De Castro, C.B.; Manhães-de-Castro, R.; Queirós, A; Costa, J.A.; Brandt, C.T. (1999). Estresse: Interações neuroendócrinas e imunológicas. *Ann Fac Med CCS-UFPE*, 44 (2): 132-137.

47. De Castro, C.B., Bureau, M.F.; Nahori, M.A.; Dumarey, C.H.; Vargaftig, B.B.; Bachelet, M. (1995). Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea-pigs. *J Appl Physiol*. 79(4):1271-1277.

48. De Franco, A.L.; Blum, J.H.; Stevens, T.L.; Law, D.A.; Chan, V.W.F.; Foy, S.P.; Datta, S.K.; Matsuuchi, L (1994). Structure and function of the B-cell antigen receptor. *Chem Immunol.* 59:156-172

49. Di Rosa, M.; Radomski, M.; Carnuccio, R.; Moncada S (1990). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(3):1246-1252.

50. Dinarello, C.A. (1994). The biological properties of interleukin-1. *Eur Citokyne Netw*, 5(6):517-531.

51. Duclos, M.; Corcuff, J-B.; Pehourcq, F.; Tabarin, A. (2001). Decreased pituitary sensitivity to glucocorticoids in endurance-trained men. *Eur J Endocrinol*, 144(4): 363 - 368.

52. Duclos, M.; Gouarne, C.; Bonnemaison, D. (2003). Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids. J Appl Physiol. 94(3):869-875.

53. Elenkov, I.J.; Kovács, K.; Duda, E.; Stark, E.; Vizi, E.S. (1992). Presynaptic inhibitory effect of TNF-α on the release of noradrenaline in isolated median eminence. *J Neuroimmunol.* 41(1):117-120.

54. Ellis, J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature,* 328 (6129):378-379.

55. Engler, H.; Stefanski, V. (2003). Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. *Psyconeuroendocrinology.* 28(8):951-969.

56. Farrell, W.S.; Kampert, J.B.; Kohl III, H.W.; Barlow, C.E.; Macera, C.A.; Paffenbarger Jr, R.S.; Gibbons, L.W.; Blair, S.N. (1998). Influences of cardiorespiratory fitness levels and other predictors on cardiovascular disease mortality in men. *Med. Sci Sports. Exerc,* 30 (6): 899-905.

57. Faure, M.; Gapin, L.; Viret, C. (2004). Stressing the virtues of the immune system. *Microbes Infect.*6(10):960-964.

58. Fehr, H.G.; Lotzerich, H.; Michna, H. (1989). Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol,* 58(6): 613-617.

59. Fehrenbach, E.; Passek, F.; Niess, A.M.; Pohla, H.; Weinstock, C.; Dickhuth, H.H.; Northoff, H. (2000). HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc,* 32(3):592-600.

60. Fehrenbach, E.; Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev.* 7:66-89.

61. Feng, N.; Pagniano, R.; Tovar, C.A.; Bonneau, R.H.; Glaser, R.; Sheridan, J.F. (1991). The effect of restraint stress on the kinetics, magnitude, and isotype of the humoral immune response to influenza virus infection. *Brain Behav Immun.*5(4):370-382.

62. Ferry, A.; Rieu, P.; Laziri, F.; Guezennec, C.Y.; elHabazi, A.; Le Page, C.; Rieu, M. (1991). Immunomodulations of thymocytes and splenocytes in trained rats. *J Appl Physiol.* 71(3):815-820.

63. Fernandez, M.D.; De la Fuente, M. (1999). Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiol Scand,* 166(1):47-53

64. Fiatarone, M.A.; Morley, J.E.; Bloom, E.T.; Benton, D.; Makinodan, T.; Solomon, G.F. (1988). Endogenous opioids and the exercise-induced augmentation of natural killer cell activity. *J Lab Clin Med,* 112(5):544-552.

65. Field, C.J.; Gougeon, R.; Marliss, E.B. (1991). Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J Appl Physiol* 71(3): 1089-1097

66. Fitzgerald, L. (1991). Overtraining increases the susceptibility to infection. *Int J Sports Med,* 12(Suppl 1): 55-58.

67. Fleshner, M.; Watkins, R.L.; Lockwood, L.L.; Bellgrau, D., Lauden-Slager, M.L., Maier, S.F. (1992). Specific changes in lymphocyte subpopulations: a potential mechanism for stress-induced immunomodulation. *J Neuroimmunol*, 41:131-142.

68. Foyer, C.; Lopez-Delgado, H.; Dat ,J.; Scott, I. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant,* 100: 241–254.

69. Fridman, J.S.; Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene,* 22: 9030–9040.

70. Fry, R.W.; Morton, A.R.; Crawford, G.P.; Keast, D. (1992). 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*, 64:218-227.

71. Fu, S.C.; Qin, L.; Leung, C.K.; Chan, B.P.; Chan, K.M. (2003). Regular moderate exercise training prevents decrease of CD4+ T-lymphocytes induced by a single bout of strenuous exercise in mice. *Can J Appl Physiol*, 28(3): 370-381.

72. Funder, J.W. (1993). Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science*, 259:1132–1133

73. Gaillard, R.C. (1994). Neuroendocrine-Immune system interactions. The Immune-hypotalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endoc Metabol (TEM)* 7(5):303-309.

74. Gedge, V.L.; Mackinnon, L.T. (1998). Natural Killer (NK) cell activation at rest and after exercise in trained and untrained subjects. *Med Sci Sports Exerc*, 30:S174.

75. Gillis, S.; Crabtree, G.R.; Smith, K.E. (1979). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. *J Immunology* 123(4): 1632-1637.

76. Glavin, G.; Paré, W.; Sandback, T.; Bakke, H.; Murison, R. (1994). Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Behavior Rev*, 18:223-249.

77. Gobatto, C.A.; de Mello, M.A.R.; Sibuya, C.Y.; de Azevedo, J.R.M.; dos Santos, L.A.; Kokobun, E. (2001). Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Bioche and Physiol*, 30: 21-27.

78. Grassilli, E.; Carcereri de Prati, A.; Monti, D.; Troiano, L.; Menegazzi, M.; Barbieri, D.; Franceschi, C.; Suzuki, H. (1992). Studies of the relationship between cell proliferation and

cell death. II. Early gene expression during concanavalin A-induced proliferation or dexamethasone-induced apoptosis of rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;188(3):1261-1266.

79. Grenn, K.J.; Rowbottom, D.G.; Mackinnon, L.T. (2002). Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *J Appl Physiol*, 92:2390-2395.

80. Gulick, T.; Chung, M.K.; Pieper, S.J.; Lange, L.G.; Schreiner, G.F. (1989). Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci*, 86(17):6753-6757.

81. Hames, B.D.; Glover, D.M. (1996). Molecular Immunology, in frontiers in molecular biology, 2nd ed. Oxford, IRL Press.

82. Hanisch, U.K.; Seto, D.; Quirion, R. (1993). Modulation of hippocampal acetylcholine release: a potent central action of interleukin-2. *J Neuroscience*, 13:3368-3374.

83. Hayes, S.C.; Rowbottom, D.; Davies, P.S.W.; Parker, T.W.; Bashford, J. (2003). Immunological changes after cancer treatment and participation in an exercise program. *Med Sci Sports Exerc*, 35(1):1-9.

84. Heath, G.W.; Ford, E.S; Craven, T.E.; Macera, C.A.; Jackson, K.L; Pate R.R. (1991). Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Med Sci Sports Exerc*, 23: 152-157.

85. Hellstrand, K.; Hermodsson; S.; Strannegard, O. (1985). Evidence for beta-adrenorecpetor-mediated of human natural killer cells. *Immunopharmacology*. 134: 4095-4099.

86. Herbert, T.B.; Cohen, S. (1993). Stress and immunity – a metanalytic review. *Psycological Medicine*, 55:364-379.

87. Hoffman-Goetz, L.; Pedersen, B.K. (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Imunol Today,* 15(8): 382-387.

88. Hoffman-Goetz, L.; Thorne, R.; Randall-Simpson, A.; Arumugan, Y. (1989). Exercise stress murine lymphocyte subset distribution in spleen, lymph nodes and thymus. *Clin Exp Imunol*, 76:307-310.

89. Hoffman-Goetz, L.; Simpson, J.R.; Cipp, N.; Arumugam, Y.; Houston, M.E.(1990). Lymphocyte subset responses to repeated submaximal exercise in men. *J Appl Physiol.* 68(3):1069-1074.

90. Hoffman-Goetz, L.; Zajchowski, S. (1999). In vitro apoptosis of lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. *J Sports Med Phys Fitness*, 39:269-274.

91. Hoffman-Goetz, L.; Fietsch, C.L.; McCutcheon, D.; Duerrstein, L. (2001). Effect of 17beta-estradiol and voluntary exercise on lymphocyte apoptosis in mice. *Physiol Behav.* 74(4-5):653-658.

92. Hsu, T.G.; Hsu, K.M.; Kong, C.W.; Lu, F.J.; Cheng, H.; Tsai, K. (2002). Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Med. Sci. Sports Exerc.* 34(3):438–442.

93. Huang, S.T.; Cidlowski, J.A. (1999). Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *FASEB J*, 13:467–476.

94. Inder, W.J.; Hellemans, J.; Ellis, M.J.; Evans, M.J.; Livesey, J.H.; Donald, R.A. (1995) Elevated basal adrenocorticotropin and evidence for increased central opioid tone in highly trained male athletes. *J Clin Endocrinol Metab.*;80(1):244-248.

95. Itoh, C.E.; Kizaki, T.; Hitomi, Y.; Hanawa, T.; Kamiya, S.; Ookawara, T.; Suzuki, K.; Izawa, T. Saitoh, D.; Haga, S.; Ohno, H. (2004). Down-regulation of beta2-adrenergic receptor expression by exercise training increases IL-12 production by macrophages following LPS stimulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 24;322(3):979-984.

96. Jefferies, W. (1991) Cortisol and immunity. *Med Hypotheses.* 34:198–208.

97. Jefferies, W. (1994). Mild adrenocortical deficiency, chronic allergies, autoimmune disorders and the chronic fatigue syndrome: a continuation of the cortisone story. *Med Hypotheses*, 42:183 – 189.

98. Ji, L.L.; Fu, R.G.; Mitchell, E.W.; Griffiths, M.; Waldrop, T.G.; Swartz, H.M. (1994). Cardiac hypertrophy alters myocardial response to ischemia and reperfusion in vivo. *Acta Physiol Scand,* 151:279-290.

99. Kappel, M.; Tvede, N.; Galbo, H.; Haarr, P.M.; Kjaer, M.; Linstow, M.; Klarlund, K.; Pedersen, B.K. (1991). Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity in mediated by epinefrine. *J Appl Physiol*, 70:2530-2534.

100. Keast, D.; Cameron, K.; Morton, A.R. (1988). Exercise and the immune response. *Sports Med* 5: 248-267.

101. Kendall, A.; Hoffman-Goetz, L.; Houston, M.; MacNeil, B.; Arumugam, Y. (1990). Exercise and blood lymphocyte subset responses: intensity, duration, and subject fitness effects. *J. Appl. Physiol,* 69: 251-260.

102. Kim, H.; Shin, S.; Kim, S.S.; Lim, B.V.; Kim, H.B.; Kim, Y.P.; Chung, J.H.; Kim, E.H.; Kim, C.J. (2003). Modulation of immune responses by treadmill exercise in Sprague-Dawley rats. *J Sports Medicine and Physical Fitness*, 43:99 -104.

103. Kizaki, T.; Haga, S.; Sakata, I.; Ookawara, T.; Segawa, M.; Sakurai, T.; Izawa, T.; Ohno, H. (2000). Swimming training prevents generation of suppressor macrophages during acute cold stress. *Med Sci Sports Exerc.* 32(1):143-148.

104. Klokker, M.; Kjaer, M.; Secher, N.H.; Hanel, B.; Worm, L.; Kappel, M.; Pedersen, B.K. (1995). Natural killer cell response to exercise in humans: effect of hypoxia and epidural anesthesia. *J Appl Physiol,* 78: 709-716.

105. Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Ann Rev Physiol*, 60:619-642.

106. Lancha Jr, A.H.; Recco, M.B.; Abdalla, D.S.; Curi, R. (1995). Effect of aspartate, asparagine, and carnitine supplementation in the diet on metabolism of skeletal muscle during a moderate exercise. *Physiol Behav* 57(2): 367-371.

107. Landmann, R.; Muller, F.B.; Perini, C.H.; Wesp, M.; Erne, P.; Buhler, F,R. (1984). Changes of immune-regulatory cells induced by psychological and physical stress: relation to catecholamines. *Clin Exp Immunol,* 58: 127-135.

108. LaPerriere, A.; Klimas, N.; Fletcher, M.A.; Perry, A.; Ironson, G.; Perna, F.; Schneiderman, N. (1997). Change in CD4+ cell enumeration following aerobic exercise training in HIV-1 disease: possible mechanisms and practical applications. *Int J Sports Med.* 18(Suppl 1):S56-S61.

109. Leandro, C.; Nascimento, E.; Manhães-de-Castro, R.; Duarte, J.A.; De Castro, C.M. (2002). Exercício Físico e Sistema Imunológico: Mecanismos e Integrações. *Rev Port Ciências Desp.* 2(5): 80-90.

110. Lee, B.S.; Chen, J.; Angelidis, C. Jurivich, D.A.; Morimoto, R.I. (1995). Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by antiinflamatory drugs results in protection against stress-induced cell damage. *Proc Natl Acad Sci.* 92(7):207-211.

111. Lee, M.C.; Lee, J.S.; Lee, M.J.; Lee, J.H.; Kim, H.I. (2001). Fas mediates apoptosis in steroid-induced myopathy of rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 27: 396-402.

112. Lin, Y.S.; Jan, M.S.; Chen, H.I. (1993). The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. *J Sports Med.* 14:86-92.

113. Lin, Y.S.; Kuo, H.L.; Kuo, C.F.; Wang, S.T.; Yang, B.C.; Chen, H.I. (1999). Antioxidant administration inhibits exercise-induced thymocyte apoptosis in rats. *Med Sci Sports Exerc,* 31(11):1594-1598.

114. Liu, J.; Yeo, H.C.; Overvik-Douki, E.; Hagen, T.; Doniger, S.J.; Chu, D.W.; Brooks, G.A.; Ames, B.N. (2000). Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J Appl Physiol* 89(1):21-28.

115. Lindsay, E.R.; Catherine, J.F. (1997). Dietary long-chain (n-3) fatty acids facilitate immune cell activation in sedentary, but not exercise-trained rats. *Amer. Soc. Nutr. Sci,* 498-504.

116. Luger, A.; Deuster, P.A.; Kyle, S.B.; Gallucci, W.T.; Montgomery, L.C.; Gold, P.W.; Loriaux, D.L.; Chrousos, G.P. (1987). Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. Physiologic adaptations to physical training. *N Engl J Med.* 316(21):1309-1315

117. Lysle, D.T.; Cunnick, J.E.; Rabin, B.S. (1990). Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhancement of mitogenic responsiveness. *Brain Behav Immun.* 4(4):269-277.

118. Mabbott, N.A. (2004). The complement system in prion diseases. *Curr Opin Immunol,* 16(5):587-593.

119. Mackinnon, L.T. (2000). Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc.* 32(7). S369-S376.

120. Mackinnon, L.T.; Hooper, S. (1994). Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining. *Int J Sports Med,* 15: S179-S183.

121. Manhães-de-Castro, R. Etude de la participation des recepteurs centraux de la serotonine du type 5-HTiB dans les reactions cerebrales au stress et dans les mecanismes d'action dos antidepresseurs. These de Doctorat – Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1995.

122. Mars, M.; Govender, S.; Weston, A.; Naicker, V.; Chuturgoon, A. (1998). High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun,* 19: 366-370.

123. McDowell, S.L.; Hughes, R.A.; Hughes, R.J.; Housh, T.J.; Johnson, G.O. (1992). The effect of exercise training on salivary immunoglobulin A and cortisol responses to maximal exercise. *Int J Sports Med,* 13(8):577-580.

124. McEwen, B.S. (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med,* 338(3): 171-179.

125. Millán, S.; González-Quijano, M.I.; Giordano, M.; Soto, L.; Martín, A.I.; López-Calderón, A. (1996). Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Sciences* 59(17):1431-1442.

126. Miyazaki, H.; Oh-Ishi, S.; Ookawara, T.; Kizaki, T.; Toshinai, K.; Ha, S,; Haga, S.; Ji, L.L.; Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.* 84(1-2):1–6

127. Moinard, C.; Chauveau, B.; Walrand, S.; Felgines, C.; Chassagne, J.; Caldefie, F.; Cynober, L.A.; Vasson, M.P. (1999). Phagocyte functions in stressed rats: comparison of modulation by glutamine, arginine and ornithine 2-oxoglutarate. *Clin Sci (Lond).*97(1):59-65.

128. Moldeveanu, A.I.; Shephard, R.J.; Shek, P.N. (2001). The cytokyne response to physical activity and training. *Sports Med.* 31(2): 115-144

129. Mooren, F.C.; Blo Ming, D.; Lechtermann, A.; Lerch, M.M.; Volker, K. (2002). Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol,* 93: 147-153.

130. Mooren, F.C.; Lechtermann, A.; Lker, K.V. (2004). Exercise-Induced Apoptosis of Lymphocytes Depends on Training Status *Med Sc. Sports Exerc,* 36(9): 1476–1483.

131. Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth, D.; Fleshner, M. (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* . 279(4): R1321-R1329.

132. Morrow, L.E.; McClellan, J.L.; Conn, C.A.; Kluger, M.J. (1993). Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide. *Am J Physiol,* 264:R1010–R1016.

133. Mosser, D.D.; Duchaine, J.; Massie, B. (1993). The DNA-binding activity of the human heat shock transcription factor is regulated in vivo by hsp70. *Mol Cell Biol.* 13(9):5427-5438.

134. Muns, G. (1994). Effect of long-distance running on polymorphonuclear neutrophil phagocytic function of the upper airways. *Int J Sports Med* 15(2):96-99.

135. Naito, H.; Powers, S.K.; Demirel, H.A.; Sugiura, T.; Dodd, S.L.; Aoki, J. (2000). Heat stress attenuates skeletal muscle atrophy in hindlimb-unweighted rats *J. Appl. Physiol.* 88: 359–363.

136. Nascimento, E.; Manhães-de-Castro, R.; De Castro, C.B.; Leandro, C.G. (2001). Pode a glutamina modular a imunidade? *Anais Faculd Med CCS – UFPE,* 46(2): 67-70.

137. Nascimento, E.; Cavalcante, T.; Pereira, S.; Palmeira, A.; Rocha, M.C.; Viana, M.T.; Manhães-de-Castro, R.; de-Castro, C.M.M.B.; Duarte, J.A.; Leandro, C.G. (2004). O exercício físico crónico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Rev Port Ciências Desp,* 4(3):26–33.

138. Nehlsen-Cannarella, S.L. (1998). Cellular responses to moderate and heavy exercise. *Can J. Physiol Pharmacol,* 76 (5):485-489.

139. Nicoletti, I; Migliorati, G.; Pagliacci, M.C.; Grignani, F.; Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 139(2): 231-239.

140. Nielsen, H.B.; Secher, N.H.; Kappel, M.; Hanel, B.; Pedersen, B.K. (1996). Lymphocyte, NK and LAK cell responses to maximal exercise. *Int J Sports Med,* 17: 60-65.

141. Nieman, D.C. (2000). Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc* 32(7):S406-S411.

142. Nieman, D.C.; Buckley, K.S.; Henson, D.A.; Warren, B.J.; Suttles, J.; Ahle, J.C.; Simandle, S.; Fagoaga, O.R.; Nehlsen-Cannarella, S.L. (1995a). Immune function in marathon runners versus sedentary controls. *Med Sci Sports Exerc.*. 27: 986-992.

143. Nieman, D.C.; Henson, D.A.; Sampson, C.S.; Herring, J.L.; Suttles, J.; Conley, M.; Stone, M.H.; Butterworth, D.E.; Davis, J.M. (1995b). The acute immune response to exhaustive resistance exercise. *Int J Sports med,* 16:322-328.

144. Nieman, D.C.; Johanssen, L.M.; Lee, J.W.; Arabatzis, K. (1990a). Infections episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness,* 30: 316-328.

145. Nieman, D.C.; Nehlsen, C.S.L.; Markoff, P.A.; Lamberton, A.J.; Yang, H.; Chritton, D.B.; Lee, J.E.; Arabatzis, K. (1990b). The effects of moderate exercise training on natural Killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med,* 11: 467-473.

146. Nieman, D.C. (2003). Current perspective on exercise immunology. *Curr Sports Med Rep.* 2(5):239-242.

147. Niess, A.M.; Baumann, M.; Roecker, K.; Horstmann, T.; Mayer, F.; Dickhuth, H-H. (1998). Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leukocytes. *J Sports Med Phys Fitness,* 38, 111-115.

148. Niess, A.M.; Hartmann, A.; Grunert-fuchs, M.; Poch, B.; Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med,* 17:397–403.

149. Niess, A.M.; Veihelmann, S.; Passek, F.; Roecker, K.; Dickhuth, H.H.; Northoff, H.; Fehrenbach, E. (1997). Exercise induced oxidative stress: DNA damage and expression of stress protein in leucocytes – an overview. *Dtsch Z Sportmed,* 48:330-341.

150. Niess, A.M.; Passek, F.; Lorenz, I.; Schneider, E.M.; Dickhuth, H.H.; Northoff, H.; Fehrenbach, E. (1999). Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes. *Free Radic Biol Med* 26(1-2):184-192.

151. Oren, M. (1994). Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death. *Semin Cancer Biol.* 5:221–227.

152. Ortega, E.; Barriga, C.; De la Fuente, M. (1993). Study of the phagocytic function of neutrophils from sedentary men after acute moderate exercise. *Eur J Appl Physiol,* 66:60-64.

153. Ortega, E.; Forner, M.A.; Garcia, J.J.; Rodriguez, A.B.; Barriga, C. (1999). Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem,* 201(1-2):41-47.

154. Ottaviani, E.; Franceschi, C. (1996). The neuroimunology stress from invertebrates to man. *Progr Neurobiol,* 48:421-440.

155. Ottaviani, E.; Franceschi, C. (1997). The invertebrate phagocytic immunocyte: key to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunology Today.* 18:169-174.

156. Ottaviani, E.; Franchini, A.; Franceschi, C. (1995). Corticotrophin releasing factor and ACTH-related fragments modulate the phagocytic activity of human monocytes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 8:39-44.

157. Ottaway, C.A.; Husband, A.J. (1994). The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today,* 15: 511-517.

158. Pasquis, P.A.; Laicisse, A.; Dejours, P. (1970). Maximal oxygen uptake in four species of small mammals. *Respir Physiol,* 9: 298-309.

159. Pastori, G.M.; Foyer C.H. (2002). Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Abscisic Acid-Mediated Controls *Plant Physiology*, 129:460–468.

160. Pastva, A.; Estell, K.; Schoeb, T.R.; Atkinson, T.P.; Schwiebert, L.M. (2004). Aerobic exercise attenuates airway inflammatory responses in a mouse model of atopic asthma. *J Immunol.* 172(7):4520-4226.

161. Pedersen, B.K.; Bruunsgaard, H. (1995). How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med,* 19:193-400.

162. Pedersen, B.K.; Tvede, N.; Christensen, L.D.; Klarlund, K.; Kragbak, S.; Halkjrkristensen, J. (1989). Natural Killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int J Sports Med,* 10:129-131.

163. Pedersen, K.B.; Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Psic Rev,* 80 (3):1055-1081.

164. Peetermans, W.E. (1995). Heat Shock proteins in medicine. *Acta Clin Belg.* 49(1):453-457.

165. Pereira, B.; Curi, R.; Kokubun, E.; Bechara, E.J. (1992). 5-aminolevulinic acid-induced alterations of oxidative metabolism in sedentary and exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 72(1):226-230.

166. Peters, C.; Lotzerich, H.; Niemeir, B.; Schule, K.; Uhlenbruck, G. (1995). Exercise, cancer and the immune response of monocytes. *Anticancer Res.* 15:175-180.

167. Peters, E.M.; Bateman, E.D. (1983) Ultra marathon running and upper respiratory tract infections: An epidemiological survey. *South African Medical Journal,* 64: 582-584.

168. Pithon-Curi, T.C.; Schumacher, R.I.; Freitas, J.J.; Lagranha, C.; Newsholme, P.; Palanch, A.C.; Doi, S.Q.; Curi, R. (2003). Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *American Journal of Physiology. Cell Physiology,* 284(6):1355-1361.

169. Powers, S.K.; Criswell, D.; Lawler, J.; Martin, D.; Lieu, F.K.; Ji, L.L.; Herb, R.A. (1993). Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *Am J Physiol,* 265:2094-2098.

170. Pyne, D.B.; Smith, J.A.; Baker, M.S.; Telford, R.D.; Weidemann, M.J. (2000). Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J Sci Med Sport,* 3(1):44-54.

171. Pyne. D.B.; Gleeson, M. (1998). Effects of Intensive Exercise Training on Immunity in Athletes. *Int J Sports Med,* 19: 138-194.

172. Raberg, L.; Grahn, M.; Hasselquist, D.; Svensson, E. (1998). On the adaptative significance of stress-induced immunosupression. *Proc. R. Soc. Lond,* 265: 1637-1641.

173. Radak, Z.; Naito, H.; Kaneko, T. (2002). Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch,* 445:273–278.

174. Robson, P.J.; Blannin, A.K.; Walsh, N.P.; Castell, L.M.; Gleeson, M. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on *in vitro* neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med,* 20: 128-135.

175. Sabapathy, S.; Kingsley, R.A.; Schneider, D.A.; Adams, L.; Morris, N.R. (2004). Continuous and intermittent exercise responses in individuals with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 59(12):1026-1031.

176. Saltin B.(1973). Metabolic fundamentals in exercise. *Med Sci Sports.* 5(3):137-146.

177. Saltin, B.; Gollnick, P.D. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. In: Handbook of Physiology. Skeletal Muscle. L.D. Peachy, R.H. Adrian and S.R. Geiger. Baltimore, Williams and Wilkinson, 1983. pp. 555-631.

178. Sapolsky, R.M.; Romero, L.M.; Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev.* 21(1):55-89.

179. Sasson, R.; Winder, N.; Kees, S.; Amsterdam, A. (2002). Induction of apoptosis in granulosa cells by TNF alpha and its attenuation by glucocorticoids involve modulation of Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 31;294(1):51-59.

180. Sasson, R.; Shinder, V.; Dantes, A.; Land, A.; Amsterdama, A. (2003). Activation of multiple signal transduction pathways by glucocorticoids: protection of ovarian follicular cells against apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun,* 311(4): 1047–1056.

181. Sasson, R.; Tajima, K.; Amsterdam, A. (2001). Glucocorticoids Protect against Apoptosis Induced Serum Deprivation, Cyclic Adenosine 3',5'- Monophosphate and p53 Activation in Immortalized Human Granulosa Cells: Involvement of Bcl-2. *Endocrinology* 142(2):802-811.

182. Sata, M.; Walsh, K. (1998). TNF-alpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat Med*, 4:415–420.

183. Schulenburg, H.; Kurz, C.L.; Ewbank, J,J. (2004). Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev*, 198:36-58.

184. Seeherman, H.J.; Taylor, C.R.; Maloiy, G.M.; Armstrong, R.G. (1981). Design of the mammalian respiratory system. II. Measuring maximum aerobic capacity. *Respir Physiol*, 44(1): 11-23.

185. Selye, H. (1936a). A syndrome produced by diverse nocuous agents. (Lond) *Nature,* 12:132-138.

186. Selye, H. (1936b). Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and Intoxication, *Brit J Exp Path*, 17:234-239.

187. Selye, H. (1955). Stress and disease. *Science,* 43(1):122:625.

188. Selye, H. (1971). Hormones and resistance. *J Pharm Sci* 125(2); 60:61.

189. Selye, H. The Stress of Life. New York: McGraw Hill, 1956.

190. Shepherd, R.E.; Gollnick, R.D. (1976). Oxygen uptake of rats at different intensities. *Pfluegers Arch*, 362: 219-222.

191. Siu, P.M.; Donley, D.A.; Bryner, R.W.; Always, S.E. (2003). Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol.* 94(2):555-560.

192. Siu, P.M.; Bryner, R.W.; Martyn, J.K.; Always, S.E. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J.* 18(10):1150-1152.

193. Smith, J.A.; Gray, A.B.; Pyne, D.B.; Baker, M.S.; Telford, R.D.; Weideman, M.J. (1996). Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. *Am J Physiol Regulatory Integrative Com Physiol*, 270: R838-R845.

194. Smith, J.A.; Telford, R.D.; Mason, I.B.; Weideman, M.J. (1990). Exercise, training and neutrophil microbicial activity. *In J Sports Med*, 11:179-187.

195. Stefansky, V.; Engler, H. (1998). Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol Behav.* 64(5):733-741.

196. Strasser, A. (1995). Death of a T cell. *Nature*, 373:385–386

197. Taylor, C.R.; Weibel, E.R. (1981). Design of the mammalian respiratory system I-IX. *Respir Physiol*, 44: 1-164.

198. Taylor, H.L.; Buskirk, E.; Henshel, A. (1955). Maximal oxygen intake as an objective measure of cardiovascular performance. *J. Appl. Physiol.* 8:73-80.

199. Taylor, C.R.; Schmidt-Nielsen, K.; Raab, J.L.(1970). Scaling of energetic cost of running to body size in mammals. *Am J Physiol.* 219(4):1104-1107

200. Tharp, G.D.; Preuss, T.L. (1991). Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J Appl Physiol*, 70(6):2535-2538.

201. Tsai, K.; Hsu T.G.; Hsu, K.M.; Cheng, H.; Liu, T.Y.; Hsu, C.F.; Kong, C.W. (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med*, 31:1465–1472.

202. Tvede, N.; Kappel, M.; Halkjaer–Kristensen, J.; Galbo, H.; Pedersen, B.K. (1993). The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukina-2 production. *Int J Sports med*, 14: 275-282.

203. Tvede, N.; Kappel, M.; Krarlund, K.; Duhn, S.; Halkjaer–Kristensen, J.; Kjaer, M.; Galbo, H.; Pedersen, B.K. (1994). Evidence that the effect of bicycle exercise on blood mononuclear cell proliferative response and subsets is mediated by epinephrine. *Int J Sports med* 15: 100-104.

204. Tvede, N.; Pedersen, B.K.; Hansen, F.R.; Bendix, T.; Christensen, L.D.; Galbo, H.; Halkjaer–Kristensen, J. (1989). Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scand. J. Immunol* 29: 383-389.

205. Ueda, S.; Masutani, H.; Nakamura, H.; Tanaka, T.; Ueno, M.; Yodoi, J. (2002). Redox control of cell death. *Antioxid. Redox. Signal*, 4:405–414.

206. Van de Stolpe, A.; Caldenhoven, E.; Raaijmakers, J.A.M.; van der Saag, P.T.; Koenderman, L. (1993). Glucocorticoid-mediated repression of intercellular adhesion molecule-1 expression in human monocytic and bronchial epithelial cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol,* 8:340– 347.

207. Van Den Bergh, P.; Rozing, J.; Nagelkerken, L. (1993). Identification of two moieties of beta-endorphin with opposing effects on rat T-cell proliferation. *Immunology,* 79:18-23.

208. Venditti, P.; Di Meo, S. (1996). Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. *Arch Biochem Biophys*, 331:63-68.

209. Vizi, E.S. (1998). Receptor-mediated local fine-tuning by noradrenergic innervation of neuroendocrine and immune systems. *Ann N.Y. Acad. Sci*, 851:388-396.

210. Wisloff, U.; Helgerud, J.; Kemi, O.J., Ellingsen, O. (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: VO_{2max} and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(3): H1301-H1310.

211. Westermann, J.; Pabst, R. (1996). How organ-specific is the migration of 'naïve' and 'memory' T cells? *Immunology Today*. 17(6):278-282.

212. Wiegers, G.J.; Croiset, G.; Reul, J.M.; Holsboer, F.; De Kloet, E.R. (1993) Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T lymphocyte mitogenesis *in vivo* and *in vitro. Am J Physiol* 265: E825 – E830.

213. Woods, J.A.; Davis, J.M. (1994). Exercise, monocyte/macrophage function, and cancer. *Med. Sci. Sports Exerc*, 26(2):147-157.

214. Woods, J.A.; Davis, J.M., Mayer, E.P.; Ghaffar, A.; Pate, R.R. (1993). Exercise increases inflammatory macrophage antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* 75(2):879-886.

215. Woods, J.A.; Davis, J.M.; Kohut, M.L.; Mayer, E.P.; Ghaffar, A.; Pate, R.R. (1994). Effects of exercise on macrophage activation for antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol* 76: 2177-2185.

216. Woods, J.A.; Davis, J.M.; Smith, J.A.; Nieman, D.C. (1999). Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sports Exerc.* 31(1): 57-76.

217. Woods, J.A.; Lu, Q.; Ceddia, M.A.; Lowder, T. (2000). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Int J Sports Med,* 21(Suppl.1):24-30.

218. Wu, C.Y.; Sarfati, M.; Heusser, C.; Fournier, S.; Rubio-Trujillo, M.; Peleman R,; Delespesse, G. (1991). Glucocorticoids increase the synthesis of immunoglobulin E by interleukin 4-stimulated human lymphocytes. *J Clin Invest* 87:870–877.

219. Wyllie, A.H.; Kerr, J.K.R.; Curie, A.R. (1980). Cell death the significance of apoptosis. *Int Ver Cytol*, 68:251-306.

220. Zwilling, B.S.; Brown, D.; Peral, D, (1991). Induction of major histocompatibility complex class II glycoproteins by interferon-gamma: Attenuation of effects of restraint stress. *Journal of Neuroimmunobiology*, 373:115 -122.

221. Zwilling, B.S.; Hilburger, M.E. (1994). Macrophage resistance genes: Bcg/Ity/Lsh. *Immunol Ser.* 60:233-45.