

RUITER SAMUEL DINIZ AGUIAR

O EXERCÍCIO FÍSICO ELEVA A FUNÇÃO FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS EM
RATOS WISTAR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
Strictu Sensu em Educação Física da Universidade
Católica de Brasília, como requisito para obtenção do
Título de Mestre em Educação Física.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Olavo de
Almeida Córdova.

Brasília
2008

A Deus pai e criador e aos meus pais.

Agradeço:

A Deus, criador de tudo, que me deu Pais e uma família especial.

A professora doutora Kátia Flávia Fernandes Silva(madrinha) que me despertou e me fez acreditar: “sou capaz”!.

A professora doutora Irmtraut Araci Hoffman Pfrimer pela sua disponibilidade e paciência no ensino.

Aos meus amigos Samyra Nery e Wanderson Nogueira pelo apoio e companheirismo nessa minha caminhada.

A todos os meus alunos de personal, sem nomeação, pelo entendimento, apoio e respeito pelo meu trabalho.

As pessoas que me ajudaram muito: Elias, Juliana Naves e Juliana Carvalho, sem vocês eu me perderia pelos caminhos do estudo.

Ao meu orientador prof. Dr. Cláudio por todos os ensinamentos e tempo dispensados a mim.

RESUMO

AGUIAR, R. S. D. O exercício físico eleva a função fagocítica de neutrófilos em ratos Wistar. 2008. Mestrado em Educação Física. Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2008.

Não é recente a idéia que existe uma relação entre os efeitos do exercício físico e as respostas imunitárias, as quais parecem ser mediadas por alterações nos sistemas nervoso, hormonal e imunitário. Entretanto, existem dúvidas sobre a intensidade do exercício físico e a melhora da resposta imunitária. Assim, o objetivo desta pesquisa foi investigar os efeitos do exercício físico sobre as funções de fagócitos circulantes em ratos Wistar utilizando-se delineamento experimental com pós-teste. Os animais foram divididos em dois grupos: um grupo controle ($n = 8$) e outro submetido a uma única sessão de 30 minutos de natação e 0% de carga ($n = 8$). Os resultados revelaram que o exercício físico foi suficiente para estimular significativamente tanto as funções fagocíticas ($P = 0,005$) quanto as microbidas ($P = 0,005$) de neutrófilos. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas nas atividades funcionais dos monócitos e na contagem global e diferencial dos leucócitos entre os grupos. Portanto, sugere-se que o exercício físico pode ser uma importante estratégia não-medicamentosa capaz de estimular o sistema imunitário inato, particularmente no que concerne à atividade funcional de neutrófilos. Outros estudos devem ser conduzidos para investigar o efeito de diferentes intensidades de exercício físico sobre as funções fagocíticas e microbidas dos fagócitos em ratos Wistar.

Palavras-chave: Exercício físico, monócitos e neutrófilos, resposta imunitária.

ABSTRACT

AGUIAR, R. S. D. Physical exercises enhance phagocytic function of neutrophils in Wistar rats. 2008. Physical Education MSc. Universidade Católica de Brasília. Brasília, 2008.

The relationship between the effects of physical exercises and the immune system responses, which seem to be mediated by alterations in the nervous, hormone, and immune systems, is not new. Nevertheless, doubts about the intensity of the physical exercises and enhancement of the immune system responses still remain. Thus, the goal of the present research was to investigate the effects of physical exercises on the functions of the circulating phagocytes in Wistar rats using experimental design with post-test. The animals were divided into two groups: a control group (n = 8) and another one submitted to only one swimming session of 30 minutes and 0% load (n = 8). The results showed that the physical exercise was enough to significantly stimulate both the phagocytic (P = 0,05) and microbicidal functions (P = 0,05) of neutrophils. On the other hand, no significant differences of monocyte functional activity and total and differential count of leucocytes between the groups were observed. Therefore, it is possible to suggest that physical exercises can be an important non-drug strategy capable to stimulate the innate immune system, particularly as to functional activity of neutrophils. Other studies should be performed to investigate the effects of different intensities of physical exercises on phagocytic and microbicidal functions of phagocytes in Wistar rats.

Key words: Physical exercise, monocytes and neutrophils, immune system responses.

LISTA DE TABELAS E QUADRO.

QUADRO 1 : Desenho experimental com pós-teste.....25

TABELA 2. Média (\pm desvio padrão) para os grupos controle e experimental sobre a contagem total e diferencial de leucócitos.....38

TABELA 3. Média (\pm desvio padrão) de função fagocítica e capacidade de produção de radicais de oxigênio de neutrófilos e monócitos circulantes, observados para o grupo experimental e controle.....39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da Câmara de Neubauer (a) e dos quadrantes (b) para a contagem global de leucócitos.....	28
Figura 2. Lâmina ilustrando a técnica de esfregaço para a contagem de leucócitos diferenciais.....	29
Figura 3. Fagocitose de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por monócito e neutrófilo.....	35
Figura 4 – Monócito que sofreu redução por NBT.....	36
Figura 5 – Neutrófilo que sofreu redução por NBT.....	36
Figura 6. Comparações da capacidade fagocítica de neutrófilos e monócitos entre os grupos	40

SUMÁRIO.

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO GERAL	12
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2.2 HIPÓTESES.....	13
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
5.1 AMOSTRA.....	23
5.2 DELINEAMENTO.....	23
5.3 PROCEDIMENTOS.....	24
5.3.1 ADPATAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO.....	24
5.3.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO.....	24
5.4 COLETA DE SANGUE.....	25
5.4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO SANGUINEO.....	25
5.4.2 LEUCOMETRIA.....	25
5.4.3 CONTAGEM GLOBAL.....	26
5.4.4 CONTAGEM DIFERENCIAL.....	27
5.5 TESTE DE FAGOCITOSE.....	28
5.5.1 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO ESTOQUE DE <i>SACCHARAMYCES CEREVISIAE</i>	28
5.5.2 SENSIBILIZAÇÃO DAS LEVEDURAS COM SORO DE RATOS WISTAR.....	29
5.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS.....	30
5.7 PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO POR FAGÓCITOS.....	30

5.7.1 TESTE DE REDUÇÃO DO NBT POR FAGÓCITOS.....	31
5.8 MORFOLOGIA DA FAGOCITOSE E REDUÇÃO POR NBT.....	32
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6 RESULTADOS.....	35
7 DISCUSSÃO.....	39
8 CONCLUSÃO.....	42
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1- INTRODUÇÃO.

Estudos sobre a influencia do exercício físico na imunidade é de grande interesse para todos. O exercício físico é um meio muito eficaz, não farmacológico, capaz de melhorar a atuação do sistema imunitário sobre doenças infecciosas. O acometimento de doenças leva o organismo a uma supressão do sistema imunitário que acarreta em morbidade e mortalidade, gerado pelo aumento do quadro infeccioso, doenças auto-imunes e até mesmo o câncer.

O exercício físico provoca alterações nas funções das células do sistema imunitário (Costa Rosa, 2002). Exercícios aeróbios exercem funções imunomoduladoras na resposta imunitária e pode até recuperar algumas de suas funções comprometidas (Leandro *et al*, 2002). Como células que atuam na primeira linha de defesa imunitária do organismo os monócitos e os neutrófilos são células fagocitárias importantes. Possíveis meios de melhoria da ação e funcionamento dessas células poderão se tornar estratégias eficientes no auxílio do combate a doenças.

Mesmo diante de alguns estudos relatando a relação do exercício físico com a imunidade celular ainda existem algumas lacunas. O exercício pode auto-regular a expressão de certas moléculas de adesão contribuindo para a marginação celular (Kurokawa *et al*, 1995; Nielsen, Lyberg 2004).

2- OBJETIVO GERAL.

Investigar o efeito da intensidade de exercícios físicos sobre a atividade imunitária celular em modelo animal.

2.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar o efeito da intensidade de exercícios físicos sobre o número de leucócitos total diferencial em ratos wistar.

2. Investigar o efeito da intensidade de exercícios físicos sobre a atividade fagocítica de monócitos e neutrófilos em ratos Wistar.

3. Investigar o efeito da intensidade de exercícios físicos sobre a atividade microbicida em monócitos e neutrófilos.

2.2- HIPÓTESES

1. O Exercício físico realizado com intensidade leve melhora a atividade fagocítica de monócitos e neutrófilos em ratos Wistar.

2. Exercício físico aumenta a atividade microbicida em monócitos e neutrófilos em ratos wistar.

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Resultados de trabalhos sugerem que exercícios físicos alteram a atividade imunitária (Pedersen e Hoffmann-goetz, 2000), havendo, por exemplo, a freqüente ocorrência de infecções do trato superior em atletas de alto desempenho. Porém, sabe-se que se os atletas forem submetidos a exercícios moderados, o risco aumentado de contrair essas doenças pode ser evitado (Rincon, 1994; Mackinson, 2000).

Shephard *et al*, (1995) verificaram em seu trabalho que atletas de *endurance* têm maior resistência a doenças infecciosas e que 76% de sua amostra, composta por 750 atletas adultos com idade entre 40 e 81 anos, apresentou menor vulnerabilidade a doenças virais em comparação com pessoas sedentárias. Portanto, é provável que o exercício físico exerça uma atividade modulatória sobre o sistema imunitário.

Atletas e praticantes regulares de exercícios físicos freqüentemente relatam que esta prática induz uma série de efeitos sobre aspectos fisiológicos, psicológicos e imunitários. Consoante com este pensamento, resultados de pesquisas recentes reforçam a hipótese de que o exercício crônico exerce importante efeito modulador sobre a dinâmica imunitária (Pedersen e Hoffmann-goetz, 2000).

Para Jonsdottir e Hoffmann (2000), o exercício realizado com intensidade moderada reduz o risco de infecções. Em contrapartida, um elevado estresse físico, particularmente acompanhado por estresse mental, é associado a linfocitopenia, neutrofilia e elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias pós-exercício (Pedersen e Toft, 2000).

Nieman e Nehlsen-cannarella (1994) identificou um crescente número de trabalhos que apresentavam, através dos exercícios agudos, um profundo efeito sobre o sistema imunitário. Porém a significância clínica dessa extensa, mas transitória alteração, no entanto, têm sido disputadas.

A identificação do patógeno e a consequente resposta imunitária apresentada em decorrência do exercício físico podem sofrer variações de acordo com intensidade, tipo de exercício, volume de treinamento, fatores de estresse tanto físicos quanto emocionais, sono, uso de álcool, fumo, entre outras. Em modelos animais, Jonsdottir *et al.* (1996) mostraram a ocorrência de aumento na função da imunidade natural em ratos espontaneamente hipertensivos após a execução voluntária de exercícios crônicos (5 a 6 semanas). Nieman (2000a) sugere que o sistema imunitário é suprimido e estressado, embora transitoriamente, depois de exercícios prolongados de *endurance* e que essas alterações não ocorrem após exercícios moderados. Portanto, é provável que o exercício físico exerça uma atividade modulatória sobre a dinâmica do sistema imune (Jonsdottir e Hoffmann, 2000; Pedersen e Hoffmann-goetz, 2000; Pedersen e Toft, 2000; Zielinski *et al.*, 2004).

Na presença de organismos reconhecidos como vírus, bactérias ou qualquer outro patógeno (agente infeccioso) em condições fisiológicas normais, o sistema imunológico prepara-se para uma série de respostas visando a defesa orgânica. Segundo Forte (2004), essa resposta do sistema imunitário pode ser classificada em primária - secundária ativa - passiva, inata - adaptativa humoral - celular.

A resposta imunitária inata é a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores e desempenha papel importante na ocorrência de doenças inflamatórias. Ela é rápida ao detectar e eliminar infecções causadas por

qualquer agente contagioso. O sistema imunológico opera como uma rede descentralizada, respondendo automaticamente a qualquer agente que perturbe a homeostasia. Todo esse processo de defesa é desencadeado por uma série de proteínas receptoras. Desse modo, quando há uma falha na ativação de receptores *toll-like* (TRL), o organismo fica suscetível a infecções. Por outro lado, quando esses receptores tornam-se hiperativos, podem ser responsáveis por inúmeros processos inflamatórios e doenças crônicas, como a artrite e o lúpus. Para que o sistema de imunidade adaptativa entre em atividade é importante a mediação de proteínas sinalizadoras chamadas citocinas, as quais não apenas induzem a inflamação, mas também ativam as células B e T. As citocinas, biomoléculas utilizadas por diversos tipos diferentes de células para sua comunicação, são específicas para cada antígeno (Janeway *et al.*, 2002).

De fato, os macrófagos, células que se originam dos monócitos e se diferenciam daqueles após migrar para os tecidos, patrulham todo o corpo procurando por sinais de infecção (Woods *et al.*, 2000; Janeway *et al.*, 2002). Quando detectam uma proteína estranha, esses disparam a resposta inflamatória. Sua ação é fagocitar e destruir o invasor que transporta uma determinada proteína e, como consequência, secretam as citocinas. Por sua vez, as células dendríticas, que têm a mesma origem dos monócitos e neutrófilos, ingerem os microrganismos e seguem para os nódulos linfáticos, nos quais apresentam fragmentos das proteínas dos patógenos às células T e liberam outras citocinas.

Recentemente, tem sido sugerido um complexo mecanismo de sinalização entre o sistema imunológico e o cérebro. Perturbações nessa rede comunicação, querem sejam hereditárias, por drogas, substâncias tóxicas ou ainda por cirurgia,

podem favorecer processos infecciosos, inflamatórios, bem como a manifestação de doenças auto-imunes e distúrbios de humor (Sternberg e Gold, 1997).

Por outro lado, sugere-se que o estresse de natureza clínica, como cirurgias, traumas, queimaduras e septicemias, propiciam ambiente hormonal e imunitário muito similar àquele provocado pela prática de exercícios físicos (Pedersen; Hoffmann-Goetz, 2000). Pedersen *et al*, (1998) e Pedersen e Hoffmann-Goetz (2000) ressaltam uma série de resultados sugerindo que diferentes estressores físicos podem estimular alterações similares no sistema imunológico. Com base nesses resultados, não é surpresa que o exercício físico seja considerado um modelo experimental de estresse (Hoffman-Goetz e Pedersen, 1994).

A resposta aguda do exercício físico pode elevar a concentração de hormônios circulantes, como adrenalina, noradrenalina, hormônio do crescimento, beta endorfinas, testosterona, estrogênio e cortisol (Galbo, 1983; Kjaer; Dela, 1996; Volek *et al*, 1997). De acordo com Galbo (1983), o aumento na concentração de cortisol no plasma sanguíneo ocorre especialmente quando o indivíduo é submetido a exercícios de longa duração. Outras alterações foram sugeridas pelo autor somente com relação ao tempo limite do exercício agudo de 1 hora. O cortisol aumenta a frequência e a intensidade dos batimentos cardíacos, sensibiliza os vasos sanguíneos à ação da noradrenalina e afeta as funções que ajudam o corpo a enfrentar uma situação estressante. Além disso, é um potente imunorregulador e agente antiinflamatório, cujo papel é crucial para evitar que o sistema imune reaja exageradamente a danos ou a lesões nos tecidos (Sternberg e Gold, 1997).

Particularmente, trabalhos de natureza farmacológicos têm investigado a relação entre a resposta imunitária e a suscetibilidade a doenças com origem inflamatória. Em estudos nos quais foram utilizados fármacos que bloqueiam os

receptores, tais como o cortisol, verificou-se aumento da ocorrência de doenças inflamatórias auto-imunes. Por outro lado, a administração de pequenas doses de cortisol injetadas em ratos aumentou a resistência desses animais a inflamações (Sternberg e Gold, 1997).

Segundo Sternberg e Gold (1997), distúrbios na comunicação entre o cérebro e o sistema imunológico, tóxicos ou infecciosos, podem contribuir para a ocorrência de labilidade da resposta do sistema imunitário a inflamações. Assim é que os hormônios estressantes liberados do cérebro, o cortisol pelas supra-renais e as substâncias neuroquímicas pelos terminais nervosos (adrenalina e noradrenalina), modificam a habilidade das células imunes de combater os agentes infecciosos. A falta de resposta cerebral ao estresse aumenta a resposta do corpo a doenças inflamatórias, ao passo que a reconstituição daquela resposta reduz a suscetibilidade do organismo à inflamação.

Além do cortisol, outro hormônio compartilhado pelo sistema nervoso central e imunológico é o liberador da corticotropina (CRH), que é sintetizado pelo hipotálamo e por outras regiões do cérebro. Uma vez liberado na corrente sanguínea pelo hipotálamo, o CRH promove a liberação de outro hormônio, o adenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, estimula a glândula supra-renal a produzir cortisol, mais conhecido como hormônio do estresse. Portanto, CRH e cortisol estão relacionados ao estresse e sua concentração na corrente sanguínea parece influenciar a resposta imunitária (Sternberg e Gold, 1997). Segundo

Malm (2004), imediatamente após o exercício há aumento na concentração de neutrófilos, bem como na capacidade de adesão e quimiotaxia de monócitos. Por outro lado, na fase de recuperação ocorre aumento do número de monócitos circulantes na corrente sanguínea. Entretanto, novos trabalhos devem ser

realizados com o propósito de explicar a relação causal entre exercícios físicos e função imunitária.

Malm (2004) também sugeriu que ratos submetidos à infecção bacteriológica por *Francisella tularensis* ainda apresentam proteção contra a doença mesmo após o exercício de natação até o esgotamento. Por outro lado, na presença de um processo infeccioso, a prática do exercício físico incrementou o quadro sintomático (Ilback, *et. al.*, 1991; Friman e Wesslen, 2000).

De acordo com Chao *et al*, (1992), ratos submetidos a exercícios moderados (45 minutos de natação por dia) não apresentaram redução na expectativa de vida quando infectados por *Toxoplasma gondii*. Por outro lado, na pesquisa de Cannon e Kluger (1984), ratos infectados por *Salmonella typhimurium* apresentaram maior longevidade quando praticaram corrida voluntária. Estudos com modelos animais sugerem que uma ou duas sessões de exercício até a exaustão podem aumentar a frequência de infecções (Nieman, 2000b).

Pedersen e Hoffmann-Goetz (2000) sugeriram que durante a execução de exercício extenuante em humanos o número de neutrófilos aumentou em relação ao nível basal. Em contrapartida, o número de monócitos não foi alterado durante o exercício, o que ocorreu somente na recuperação.

Os neutrófilos e os monócitos, que são encontrados na circulação sanguínea, são oriundos da mesma célula progenitora, embora com distintas linhagens. Os neutrófilos, os monócitos e algumas outras células são provenientes da linhagem mielóide. Na presença de interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos, monócitos/macrófagos (GM-CSF) e fator estimulador de

crescimento de colônias de monócitos/macrófagos (M-CSF), células essas de importância no desenvolvimento de uma resposta imunológica.

Os neutrófilos são células de tamanho intermediário, com pequenos grânulos citoplasmáticos e núcleo multilobulado com projeções ciliares e grupamentos CD16 na membrana citoplasmática; possui meia-vida curta, de dois a três dias. São as células iniciais do processo inflamatório, ou seja, são as primeiras células que afluem para o local da defesa imunológica, possuindo mecanismos muito eficazes.

Os monócitos são células grandes, com núcleo em ferradura, citoplasma com membranas onduladas, grânulos azurofílicos pálidos e complexos de Golgi grande, passíveis de permanecer na circulação por longos períodos, apresentando em sua superfície grupamento de diferenciação CD14. Representam 15% dos leucócitos circulantes na corrente sangüínea (Mackinson, 2000) e dá origem à quase totalidade dos macrófagos, os quais, após cerca de três dias na corrente sangüínea, atingem o local de atuação, onde sofrem diferenciação final com distintas alterações morfológicas, recebendo denominações conforme seu aspecto e a localização. Têm em geral meia-vida longa e baixa taxa de proliferação (Forte, 2004).

Os monócitos produzem a proteína IL-1, que estimula outro tipo de glóbulo branco, o linfócito, a produzir a interleucina-2 (IL-2), a qual, por sua vez, induz os linfócitos a se transformar em células imunes maduras. Alguns linfócitos maduros, denominados plasmócitos, produzem anticorpos que combatem as infecções, enquanto os linfócitos citotóxicos matam diretamente os vírus (Sternberg e Gold, 1997).

O leite materno contém neutrófilos e monócitos (Forte, 2004), os quais representam de 50% a 60% do total dos linfócitos circulantes na corrente sangüínea

(Smith, 1997; Pedersen e Hoffmann-Goetz, 2000) e são objeto de investigações experimentais por estarem disponíveis nessa quantidade. Sua principal função é fagocitar, isto é, ingerir germes que são destruídos em vesículas intracelulares após sua internalização, o que eles realizam tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (Janeway *et al*, 2002).

Os neutrófilos e os monócitos apresentam mecanismos análogos em sua atividade fagocitária. Entretanto, os fagócitos mononucleares, dentre eles os monócitos, são considerados melhores células fagocíticas, pois seus grânulos citoplasmáticos são refeitos cerca de 8 a 20 horas após a eliminação do patógeno, estando aptos a nova fagocitose, enquanto os neutrófilos não mais refazem seus grânulos e sofrem lise caso mantenham novo contato com microrganismos (Forte, 2004).

O processo de fagocitose, que começa com a aderência da célula e vai até a destruição do antígeno, passa por alguns estágios, os quais, segundo Rincon (1994), são: aderência, quimiotaxia, ataque, ingestão e morte do agente patológico.

Fuente *et al*, (1990), em trabalho com exercício exaustivo (natação) aplicado a ratos idosos e sedentários, verificaram que houve aumento da reação de redução por NBT (nitroblue tetrazólio) nos macrófagos. Fuente *et al*, (1993), em pesquisa utilizando ratos sedentários e treinados submetidos à natação exaustiva, também encontraram aumento na redução de macrófagos pela técnica de NBT.

Os monócitos e os macrófagos são denominados fagócitos profissionais por apresentarem a capacidade de refazer seus grânulos citoplasmáticos e de ingerir partículas de tamanho grande. Os macrófagos têm o maior potencial fagocítico por serem maiores do que as demais células fagocitárias, com citoplasma mais

extenso, membrana citoplasmática com muitos ligantes e condições de ingerir grande quantidade de microrganismos (Forte, 2004). A eficiência fagocítica indica a eficácia em fagocitar antígenos (Barriga *et al.*, 2002), combatendo, assim, a possível infecção ou inflamação provocada pela ação destes.

Muniz-Junqueira *et al.*, 2003, descreveram um teste simples para avaliar a fagocitose e fornecer uma tabela de valores de referência para a avaliação normal por idade. Em síntese, este teste consiste em colocar duas gotas de sangue em uma lâmina de microscópio, incubar com *Sacccharomyces cerevisiae* e avaliar a fagocitose pelo microscópio. Os resultados obtidos pelos pesquisadores citados foram comparáveis ou melhores do que aqueles obtidos com o uso de técnicas usuais. A técnica empregada por aqueles autores, de autoria de Park *et al.* (1968), que será descrita na íntegra nesta qualificação na seção material e métodos, é realizável e rápida, necessita somente poucas gotas de sangue e permite melhor preservação da função celular em decorrência da manipulação à qual a célula é submetida (Muniz-Junqueira *et al.*, 2004). O índice fagocitário é calculado como o número médio de células de *S. cerevisiae* fagocitadas por monócitos ou neutrófilos multiplicado pelo percentual dessas células engajadas na fagocitose (Muniz-Junqueira *et al.*, 1992). Muniz-Junqueira *et al.* (2003) encontraram índices de fagocitose diferenciados por idade. Em sua avaliação com crianças que nasceram de parto cesariana, quando usaram leveduras não sensibilizadas, as quais tiveram como reagente o soro fetal bovino para estimular a fagocitose feita pelos monócitos e neutrófilos, os autores observaram que a fagocitose foi mais baixa do que a verificada na população de adultos. Quando empregaram leveduras sensibilizadas, as quais tiveram como reagente o soro extraído do sangue dos próprios sujeitos, o índice fagocitário de monócitos e neutrófilos aumentou significativamente.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- AMOSTRA

Foram utilizados 16 ratos machos da raça Wistar, obtidos na Empresa Biogre (Planaltina-DF), pesando cerca de 150–200 g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (três animais por caixa) cobertas com grade metálica, em ambiente mantido a temperaturas em torno de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com $55 \pm 10\%$ de umidade e ciclo claro/escuro de 12 horas (estantes climatizadas). Todos os sujeitos foram alimentados com ração Labina (Paulínia-SP) e água *ad libitum* durante o período de duas semanas para aclimação ao ambiente em que ficaram alojados.

5.2- DELINEAMENTO

Trata-se de um estudo experimental com pós-teste (Tabela 1). Os animais foram randomicamente alocados para o grupo controle (n=8) ou experimental (n=8). Os animais do controle não foram submetidos ao exercício físico, enquanto que os animais do grupo experimental (E) realizaram uma única sessão de natação.

Quadro 1. Desenho experimental com pós-teste.

		Variáveis dependentes
Grupo	Tratamento	
Controle (n=8)	X	Leucócito total e diferencial; testes funcionais de fagócitos (atividade fagocítica e microbicida de monócitos e neutrófilos).
Experimental(n=8)	Exercício	Leucócito total e diferencial; testes funcionais de fagócitos (atividade fagocítica e microbicida de monócitos e neutrófilos).

5.3- PROCEDIMENTOS

5.3.1- ADAPTAÇÃO AO MEIO LÍQUIDO.

Utilizou-se um tanque com 65 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade tanto para a adaptação ao meio líquido quanto ao exercício físico. A temperatura da água foi mantida cerca de $31 \pm 1^\circ \text{C}$.

O grupo experimental passou por um período de adaptação ao meio líquido que teve duração de três dias. No primeiro dia, a água foi mantida em 15 cm de profundidade; no segundo dia, a altura da coluna de água passou para 30 cm; no terceiro dia, a profundidade da água foi de 45 cm. O tempo de adaptação em todas as etapas foi de quinze minutos (Jonsdottir et al., 1996). Um dos propósitos deste procedimento foi o de reduzir a ansiedade dos animais no novo ambiente.

5.3.2- PROTOCOLO DE EXERCÍCIO.

Para a prática do exercício de natação utilizou-se um tanque com 65 cm de diâmetro e a profundidade 45 cm de água a temperatura cerca de $31 \pm 1^\circ \text{C}$. A duração do exercício foi de 30 minutos. Dois ratos exercitaram-se por sessão de exercício.

5.4- COLETA DE SANGUE

5.4.1. Determinação da concentração do lactato sanguíneo.

Para mensurar a concentração de lactato sanguíneo, amostras de sangue (25 μ l) foram coletadas nos animais do grupo controle e, após a sessão de exercícios, no grupo experimental, a partir de um pequeno corte na extremidade caudal. A fim de evitar diluição do lactato com água residual no momento da coleta, os animais tiveram as caudas enxutas com toalhas absorventes. As amostras coletadas foram transferidas para tubos Eppendorf contendo 50 μ l de fluoreto de sódio 2%. As concentrações de lactato foram determinadas com o analisador bioquímico YSI Modelo 2700 SELECT (Yellow Springs, OH, USA). Este parâmetro fisiológico foi utilizado a fim de quantificar a demanda de esforço físico, bem como o perfil do mesmo e a relação com o metabolismo predominante.

5.4.2. Leucometria

Para a avaliação das funções fagocíticas, os animais foram sedados com tampão de algodão embebido em éter PA. Após realizou-se a coleta de sangue através de punção cardíaca utilizando seringas estéreis e descartáveis (5 ml) umedecidas com heparina líquida. A seguir, do volume de sangue coletado (cerca de 2 ml), parte foi pipetado em tubos *Eppendorf* contendo Fluoreto de Sódio a 1% e o restante utilizado para a contagem global de leucócitos, diferencial e atividade funcional dos fagócitos.

5.4.3- Contagem global

A contagem global foi realizada a partir da diluição do sangue com o líquido de Turk 1:20 (20 μ l de sangue para 380 μ l de líquido de Turk). O material biológico (leucócitos diluídos), com o auxílio de pipeta, foi depositado sobre a lamínula, de modo a preencher completamente o espaço e, deste modo evitando-se a formação de bolhas. A seguir os leucócitos presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer *improved* (figura 1) foram contados manualmente utilizando o contador de células modelo 60.103. O resultado foi calculado através da soma do número de leucócitos nos quatro quadrantes: $\text{leucócitos/mm}^3 = [(Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4)/4 \times 10 \times 20]$, onde: $Q_n = n^\circ$ de células no quadrante da câmara; 10 = fator de conversão para 1 mm³ (profundidade da lâmina); 20 = fator de conversão da diluição (Figura 1).



Figura 1- Ilustração da Câmara de Neubauer (a) e dos quadrantes (b) para a contagem global de leucócitos.

5.4.4- Contagem Diferencial

Para a realização da contagem diferencial dos leucócitos uma gota de sangue (contendo aproximadamente 10 μ l de sangue) foi depositada a ± 1 cm da extremidade da lâmina. Outra lâmina, denominada extensora, foi colocada com uma inclinação aproximada de 45°. Depois de aproximada, de forma a permitir que o sangue tocasse e se espalhasse pelo vértice do ângulo até o meio centímetro das margens da lâmina, fez-se o deslizamento rápido no sentido contrário com um movimento uniforme, mantendo a mesma angulação e o contato entre as duas lâminas (figura 2). Após a secagem, fixação com álcool metílico PA (metanol) por dois minutos e proceder à coloração com Giemsa a 10% durante dez minutos, preparado em tubo de ensaio misturando três gotas para cada 2ml de água destilada, foi realizada a contagem no microscópio ótico (1000x) em imersão. A contagem diferencial de leucócitos foi observada 100 células em campos distribuídos aleatoriamente conforme procedimentos descritos por Silva e Hashimoto (1999).

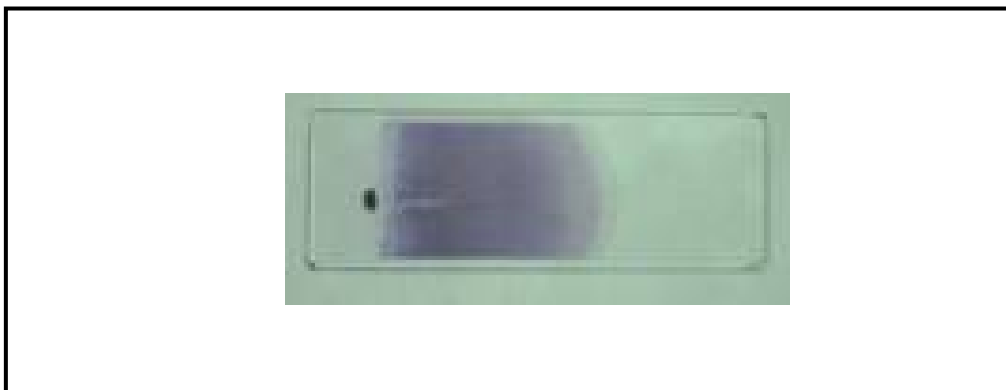


Figura 2. Lâmina ilustrando a técnica de esfregação para a contagem de leucócitos diferenciais.

5.5- TESTE DE FAGOCITOSE

Com o objetivo de avaliar a função dos fagócitos foram realizados dois testes: o primeiro, para investigar a capacidade de fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* e, o segundo, para avaliar a capacidade de redução do nitroblue tetrazolium (NBT) a Formazan. Ambos refletem o estado funcional dos fagócitos a fim de reconhecer, fagocitar e exercer o metabolismo oxidativo. Obtenção de neutrófilos e monócitos a partir da circulação central.

As técnicas para obtenção de neutrófilos e monócitos utilizados nesta pesquisa foram as descritos por Muniz-Junqueira et al, (2003;2004).

5.5.1- PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO ESTOQUE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*.

Brevemente, para a preparação da suspensão estoque de leveduras, a técnica utilizada foi descrita por Lachmann e Hobart, 1978. Por essa técnica há modificação na superfície da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que facilita a adsorção do componente C3 do complemento e moléculas de imunoglobulinas.

Para a preparação da suspensão estoque de leveduras, 50 g de fermento fresco (Fleischmann®) foram suspensos em 220 ml de solução salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2 e a suspensão autoclavada a 120°C por 30 minutos e, em seguida, lavada com STF, pH 7,2, por centrifugação, até obter-se sobrenadante límpido que foi desprezado. O sedimento foi suspenso em 28 ml de STF contendo 0,1 M de 2-mercaptoetanol. Após duas horas de incubação a 37°C com agitação, a suspensão foi lavada novamente e o sedimento restante ressuspenso em 55 ml de

solução iodoacetamida 0,02 M em STF, pH 7,2. Após mais duas horas de incubação com agitação, a suspensão foi lavada 3 vezes e ressuspensa em 220 ml de STF, pH 7,2. A suspensão, autoclavada por 30 minutos a 120⁰C e, em seguida, lavada com STF, pH 7,2, por centrifugação, até obter-se sobrenadante límpido; ressuspensa em 110 ml de tampão veronal, pH 7,2, contendo azida sódica (200 mg/l) como preservativo. A suspensão foi alíquotada em volumes menores e mantida a 4⁰C, podendo ser reutilizada posteriormente.

5.5.2- SENSIBILIZAÇÃO DAS LEVEDURAS COM SORO DE RATOS WISTAR.

Uma alíquota de 30 µl foi retirada da suspensão estoque e o volume completado para 1 ml com STF, lavando-se 3 vezes por centrifugação, agitando-se a cada lavagem. Após, 20 µl foram adicionados a 980 µl de STF (diluição 1:50) e, 10 µl das leveduras foram quantificadas em Câmara de Neubauer nos 4 quadrantes da periferia e no central da área destinada à contagem de eritrócitos.

Calculou-se o número de leveduras (I) presentes na suspensão de 500 µl, onde: $I = \text{soma do número de leveduras contadas nos 5 quadrados} \times 5 \times \text{volume (em ml)} \times \text{diluição} \times 10 \times 1000$.

Foram adicionados à suspensão de leveduras *pool* de soro de ratos Wistar a 20% (mantido a - 20⁰C), incubando-se em banho-maria, a 37⁰C por 30 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Com isto, as leveduras foram sensibilizadas, ou seja, componentes do complemento (especialmente C3) e Ig (especialmente IgG) são adsorvidos à sua superfície. Estes componentes funcionam como opsoninas, facilitando a ligação da levedura aos receptores para complemento e imunoglobulina dos fagócitos, permitindo a fagocitose.

5.6- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA DE NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS

Os fagócitos obtidos foram incubados em câmara úmida a 37⁰C por 30 minutos em duplicatas preparações com 20 µl de suspensão de leveduras opsonizadas. A preparação foi lavada com STF, pH 7,2, a 37⁰C para eliminar as leveduras não fagocitadas e, então, dispôs-se uma gota de solução Hanks-Tris tratadas com 30% , secadas a quente, fixadas com metanol e coradas com Giemsa 10% por 10 minutos.

Após o procedimento descrito anteriormente as lâminas de microscopia com Depex foram montadas e examinadas ao microscópio óptico com objetiva de imersão. Foram avaliados 200 neutrófilos e 200 monócitos por preparação e determinado o índice fagocitário calculado pela multiplicação da média de leveduras ingeridas por fagócito pela proporção de fagócitos envolvidos na fagocitose (Shaw & Griffin, 1981).

5.7- PRODUÇÃO DE RADICAIS DE OXIGÊNIO POR FAGÓCITOS

Com a finalidade de analisar a produção de superóxido por neutrófilos e monócitos dos animais, os fagócitos submeteram-se ao teste de redução do NBT, um aceptor de elétrons utilizado para detectar indiretamente a produção deste ânion (Nydegger *et al.*, 1973). Campbell e Douglas, 1997, desenvolveram essa técnica avaliando assim o mecanismo microbicida dos fagócitos. As células NBT positivas são as únicas a terem seus citoplasmas visualizados, já que o processo de redução converte o NBT de um composto amarelo solúvel em um material insolúvel

de coloração azul, denominado formazan, que se precipita no citoplasma do fagócito, identificável por microscopia óptica. Os radicais do oxigênio são produzidos pela enzima NADPH oxiredutase, que participa de um complexo enzimático ligado à membrana celular que catalisa a transferência de elétrons do NADPH citoplasmático para o oxigênio extracelular.

5.7.1- Teste de redução do NBT por fagócitos

O teste de redução do NBT foi realizado após a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca, como citado anteriormente. Foram depositados 40 µl de sangue em cada um dos campos das lâminas, as quais foram incubadas em câmara úmida (água com sulfato de cobre), a 37°C por 45 minutos, para permitir a aderência dos fagócitos. Após esse período, as lâminas foram retiradas da câmara e lavadas cuidadosamente com PBS para eliminar as células não-aderentes. A seguir, foram colocados 20 µl de solução de NBT a 0,05% (0,00025g de NBT dissolvidos em 500 µl de solução HANKS-Tris) em cada uma das escavações. Tal procedimento foi executado em duas lâminas. Em uma lâmina todas as escavações continham 20 µl de solução com leveduras sensibilizadas (1:5), aproximadamente 64500 leveduras, e na outra, leveduras não-sensibilizadas. Em seguida, as lâminas foram incubadas a 37°C por 20 minutos em câmara úmida e o sobrenadante foi desprezado. As lâminas foram, então, retiradas da câmara e lavadas delicadamente com PBS para retirar as leveduras não fagocitadas. Em cada campo foi acrescentada uma gota de solução HANKS-Tris com 30% de soro para a preservação das células. Depois desse procedimento, o sobrenadante foi desprezado e as lâminas foram secas a quente. Cada lâmina foi fixada com metanol PA por 1 minuto e, após secagem completa, as escavações foram contra-coradas

com solução de GIEMSA 1% por 5 minutos. O corante excedente foi desprezado e as lâminas foram lavadas com água corrente e completamente secas. Feito esse processo, as lâminas foram examinadas ao microscópio ótico com objetiva de imersão. Em cada uma das preparações foram examinados 200 fagócitos, determinando-se a porcentagem daqueles que reduziram NBT. O teste de NBT, que objetiva avaliar o mecanismo microbicida dos fagócitos pela sua habilidade de produzir ânion superóxido, foi adequado para uso no presente estudo utilizando-se a técnica desenvolvida por Campbel e Douglas (1997).

5.8- MORFOLOGIA DA FAGOCITOSE E REDUÇÃO POR NBT

Na figura 3 encontra-se um monócito e um neutrófilo que realizaram fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae*, na figura 4 um monócito e na figura 5 um neutrófilo que sofreram redução por NBT.

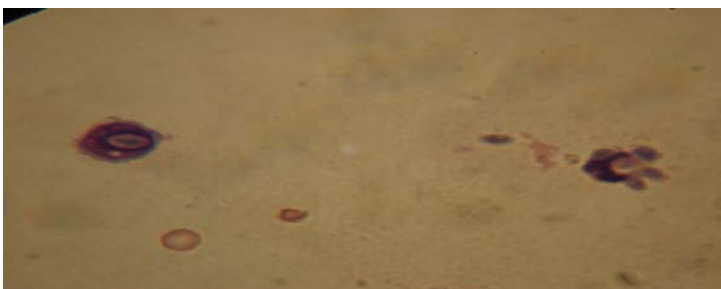


Figura 3. Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por monócito e neutrófilo.

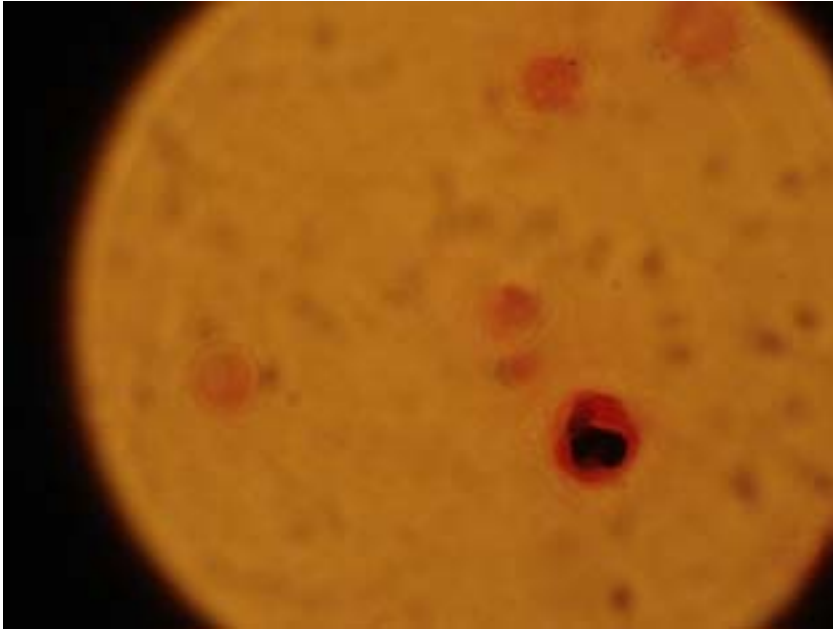


Figura 4 – Monócito que sofreu redução por NBT.

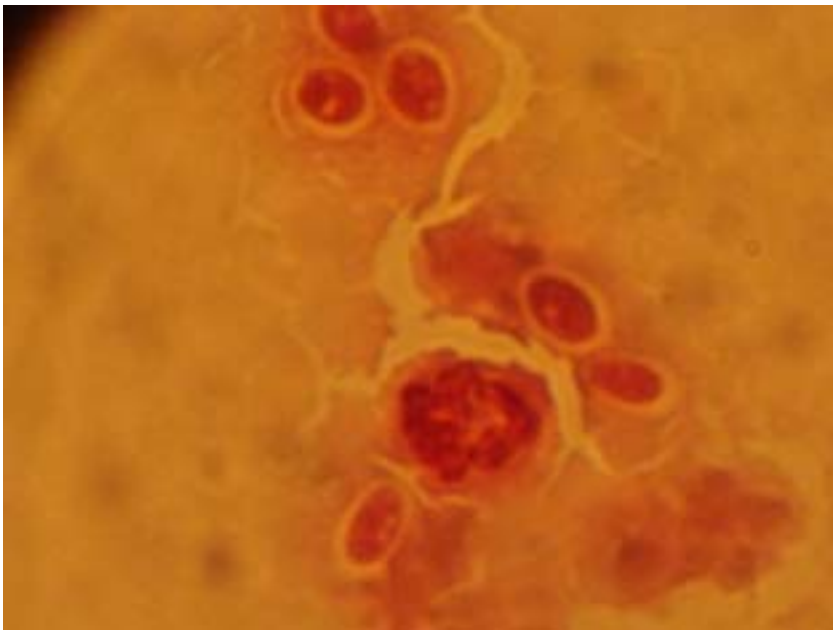


Figura 5 – Neutrófilo que sofreu redução por NBT.

5.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para a comparação entre as médias dos dois grupos sobre cada variável dependente. Diferenças com valores bicaudais de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. O pacote estatístico SPSS versão 8.0 foi utilizado para as análises dos dados e elaboração das Figuras.

6- RESULTADOS

A análise exploratória dos dados revelou um caso extremo (*outlier*) na variável proporção de fagócitos redutores de NBT no grupo experimental. Após correção conforme procedimentos descritos por Tabachnick e Fidell (1996), o resultado do teste de normalidade Kolmogorov – Smirnov confirmou a distribuição normal dos dados.

Diferença significativa ($P < 0,001$) foi encontrada entre as médias de concentração de lactato sangüíneo para os grupos controle ($\bar{x} = 1,7 \pm 0,3$ mMol/l) e experimental ($\bar{x} = 2,8 \pm 0,5$ mMol/l). A comparação entre os valores médios de leucócitos totais e diferenciais observados nos grupos experimental e controle não revelou diferenças significativas destas freqüências celulares (Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm desvio padrão) observada para os grupos controle e experimental sobre a contagem total (n° de células $\times 10^3 / \text{mm}^3$ de sangue) e diferencial de leucócitos.

	Controle (n=8)	Experimental (n=8)	Valor P
Leucócitos totais	7,6 \pm 1,7	7,8 \pm 1,7	0,68
Neutrófilos	16,3 \pm 5,3	15,6 \pm 5,3	0,64
Monócitos	2,9 \pm 1,4	3,7 \pm 2,0	0,25
Linfócitos	79,90 \pm 7,0	82,6 \pm 5,4	0,51

No que se refere às funções fagocíticas de monócitos e neutrófilos, alterações foram observadas comparativamente entre os grupos e encontram-se representadas na Tabela 3 e ilustradas na Figura 6. De modo geral, animais do grupo experimental apresentaram função fagocítica aumentada quando

comparados com os controles. A média do índice de fagocitose de neutrófilos nos animais que se exercitaram foi quase duas vezes superior em relação ao grupo sem exercício. O menor índice de fagocitose verificado neste grupo foi associado tanto ao menor número de *S. cerevisiae* fagocitados como em uma menor proporção de neutrófilos fagocitantes. Em contrapartida, não foi observado diferença estatisticamente significativa sobre o índice de fagocitose para monócitos entre os grupos.

Tabela 3. Média (\pm desvio padrão) das variáveis de função fagocítica *in vitro* e capacidade de produção de radicais de oxigênio microbicida avaliados por meio do teste de redução *nitro blue tetrazolium* de neutrófilos e monócitos circulantes, observados para o grupo experimental e controle.

	Controle (n=8)	Experimental (n=8)	Valor P
Nº de <i>S. cerevisiae</i> fagocitadas/monócito	2,08 \pm 0,4	2,30 \pm 0,6	0,414
Nº de <i>S. cerevisiae</i> fagocitadas/neutrófilo	2,71 \pm 0,7	3,58 \pm 1,0	0,060
% monócitos que fagocitaram	69,75 \pm 12,1	71,75 \pm 9,0	0,713
% neutrófilos que fagocitaram	78,69 \pm 5,6	90,62 \pm 8,3	0,005
Índice de fagocitose (monócitos)	143,00 \pm 24,5	167,69 \pm 55,7	0,271
Índice de fagocitose (neutrófilos)	213,06 \pm 53,2	328,94 \pm 109,0	0,017
% redução NBT (monócitos)	73,69 \pm 7,2	73,44 \pm 7,7	0,947
% redução NBT (neutrófilos)	76,69 \pm 10,9	88,25 \pm 5,6	0,018

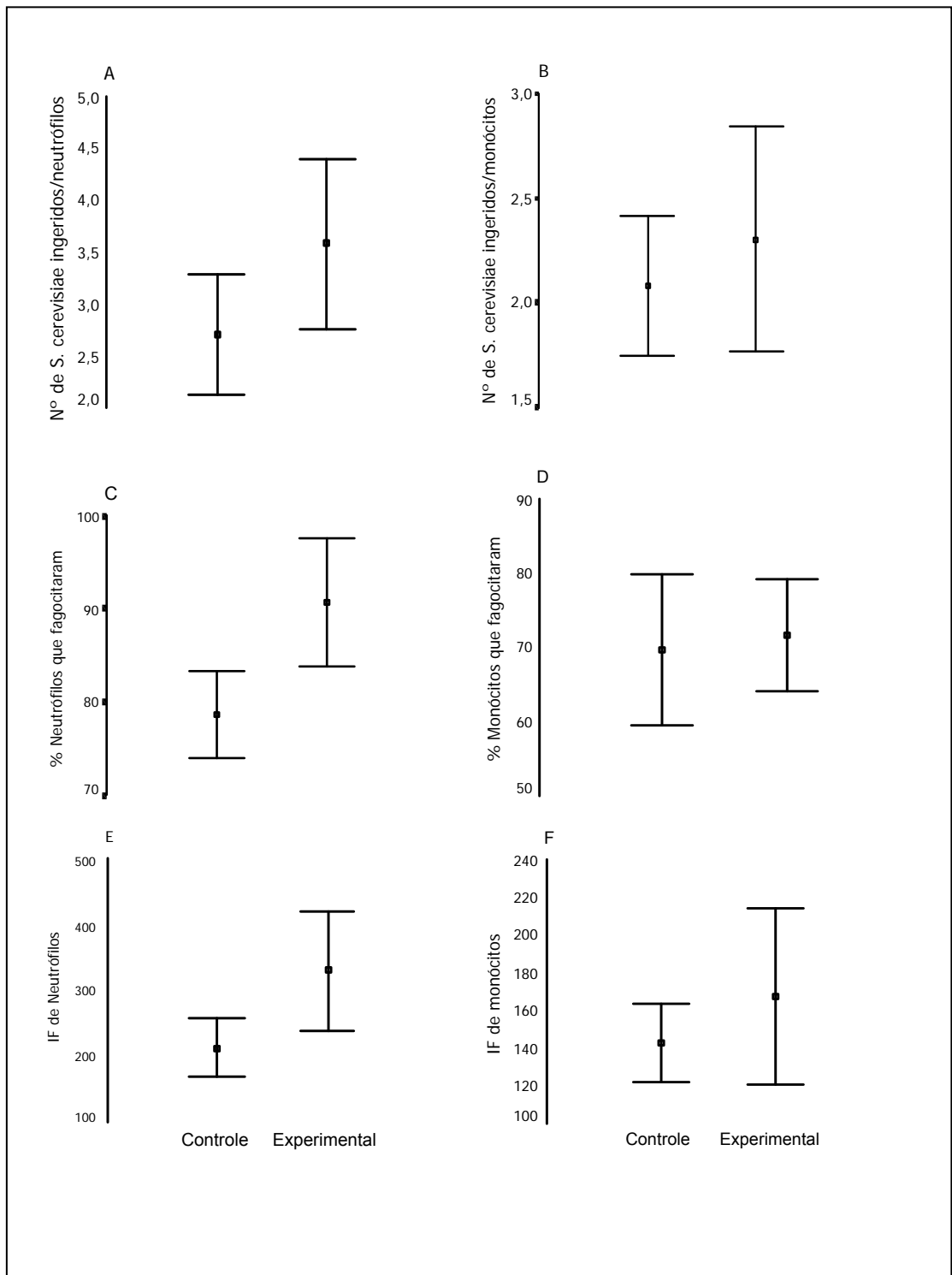


Figura 6. Comparações da capacidade fagocítica de neutrófilos (esquerda) e monócitos (direita) entre os grupos controle (n = 8) e experimental (n = 8). As médias representam o número de *Saccharomyces cerevisiae* fagocitadas (acima), o percentual de fagócitos que fagocitaram (meio) e os índices de fagocitose (IF) (inferior). As linhas verticais representam os intervalos de confiança de 95% para as médias. Testes *t* para amostras independentes foram utilizados para comparar os grupos.

Por outro lado, a capacidade para produzir espécies reativas de oxigênio, avaliada por meio do percentual de redução de NBT, também foi influenciada pelo exercício físico. Os resultados revelaram que este mecanismo microbicida de neutrófilos foi mais eficiente no grupo experimental em relação ao controle. Entretanto, os monócitos não exibiram diferenças significativas em sua capacidade de redução de NBT conforme indicado na Tabela 2 e Figura 6.

7- DISCUSSÃO

Neste trabalho investigou-se o efeito do exercício físico como modulador da função fagocítica de monócitos e neutrófilos em ratos Wistar. Verificou-se que o exercício realizado foi adequado para estimular às funções fagocíticas e microbidas de neutrófilos, porém o mesmo não se observou para os monócitos.

O teste do NBT que objetiva avaliar o mecanismo microbicida dos fagócitos, detectando indiretamente a produção do ânion superóxido (Nydegger *et al.*, 1973), mostrou resultados que revelaram mecanismos microbidas de neutrófilos mais eficientes no grupo experimental em relação ao controle. Fuente *et al.* (1990), em trabalho com exercício exaustivo (natação) aplicado a ratos idosos e sedentários, verificaram que houve aumento da reação de redução por NBT (nitroblue tetrazolium) nos macrófagos. Fuente *et al.* (1993), em pesquisa utilizando ratos sedentários e treinados submetidos à natação exaustiva, também encontraram aumento na redução de macrófagos pela técnica de NBT. Tais resultados sugerem que o exercício físico seja um importante agente externo que torna mais eficiente o mecanismo de redução por NBT.

Com respeito ao fato da média do índice de fagocitose de neutrófilos nos animais que exercitaram ter sido quase duas vezes superior em relação ao grupo controle, algumas questões foram levantadas: 1 - a maior capacidade fagocítica pelo número de leveduras captadas; 2 – a maior capacidade microbicida; 3 - a maior potencial em reduzir o NBT a formazan, corroborando assim com os resultados de Fuente *et al.* (1990) e Fuente *et al.* (1993).

Por outro lado, é provável que a diferença verificada sobre a função fagocítica entre neutrófilos e monócitos seja conseqüência de um maior número de

neutrófilos encontrados na circulação sangüínea. Também pelo fato de serem as células que primeiro atuam nas repostas inflamatórias agudas, respondendo assim, mais rapidamente aos estímulos antigênicos (Abbas e Lichtman, 2005). Diante de tais evidências, sugere-se que o exercício físico, mesmo em baixa intensidade, pode representar uma importante estratégia não farmacológica, com o propósito de proteger o organismo contra doenças infecciosas.

Não foram reveladas diferenças significativas na contagem global e diferencial de células (monócitos/neutrófilos) apresentadas entre os dois grupos do nosso estudo. Averiguou-se o total de células envolvidas imediatamente após a sessão de exercício sem expressões significativas. Porém, Pedersen e Hoffmann-Goetz (2000) sugeriram que durante a execução de exercício extenuante em humanos o número de neutrófilos aumentou em relação ao nível basal. Em contrapartida, o número de monócitos não foi alterado durante o exercício, o que ocorreu somente na recuperação. É provável que a diferença existente entre os resultados encontrados em nosso estudo e os citados acima seja em função da intensidade do exercício empregada. Em outras palavras a intensidade do exercício foi insuficiente para produzir a desmarginalização dos leucócitos na circulação periférica.

No entanto, em nossa investigação algumas importantes limitações são apontadas no sentido da generalização dos resultados para modelos humanos. Outro aspecto limitante refere-se ao fato que testes laboratoriais que submetem as células (fagócitos/monócitos) a uma extensa manipulação, que podem comprometer as respostas funcionais destas células. Entretanto, Muniz-Junqueira et al. (2003) relatam que o teste de fagocitose pode ser utilizado em diversos tipos de estudos,

por exemplo, na investigação de quadros de infecções crônicas em humanos e para avaliar os efeitos de drogas sobre o mecanismo de defesa.

8-CONCLUSÃO

O exercício físico realizado em nosso estudo foi suficiente para estimular às funções fagocíticas e microbidas de neutrófilos, o que não foi observado nos monócitos. O exercício também não foi capaz de modificar o número de leucócitos total e diferencial nos dois grupos de animais. Portanto, sugere-se que o exercício físico pode ser uma importante estratégia não medicamentosa capaz de estimular o sistema imunitário inato. Sugere-se que outras intensidades de exercício físico sejam investigadas em modelos animais a fim de se averiguar qual a mais adequada em proporcionar o estímulo mais eficiente às funções fagocíticas e microbidas dos fagócitos.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABBAS, A.K.; LICHMAN, A.H. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005,580 p.

BARRIGA, C.; MARTIN, M. I.; ORTEGA, E.; RODRIGUEZ, A. B. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone in stress and their relationship with phagocytic activity. **Journal of Neuroendocrinology**, 2002. v. 14, p. 691-695,

BESEDOVSKY, H.; DEL RAY, A.; SORKIN, E.; PRADA, M. da; BURRI, R.; HONNEGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science**, 1983. v. 221, n. 4610, p. 564-566,

CAMPBELL, D. E.; DOUGLAS, S. D. Phagocytic cell functions. I. Oxidation and chemotaxis. In: ROSE, N. R.; MACARIO, E. C. de; FOLDS, J. D.; LANE, H. C.; NAKAMURA, R. M. (Ed.). **Manual of clinical laboratory immunology**. 5th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p.320-328.

CANNON, J. G.; KLUGER, M. J. Exercises enhance survival rate in mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1984. v. 175, p. 518-521,.

CHAO, C. C.; STRGAR, F.; TSANG, M.; PETERSON, P. K. Effects of swimming exercise on the pathogenesis of acute murine *Toxoplasma gondii* Me49 infection. **Clinical Immunology and Immunopathology**, 1992.v. 62, N. 2, p. 220-226,.

COSTA ROSA, LFBP, VAISBERG MW. Influências do exercício na resposta imune. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 2002;8:167-172.

FORTE, W. N. **Imunologia básica e aplicada**. São Paulo: Artmed, 2004. 3540 p.

FRIMAN, G. ; WESSLEN, L. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: infections and exercise in high-performance athletes. **Immunology and Cell Biology**, 2000. v. 78, p. 510-522,

FUENTE, M. de la; MARTIN, M. I.; ORTEGA, E. Changes in the peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 1990. v. 13, p. 189-198,

FUENTE, M. de la; MARTIN, M. I.; ORTEGA, E. Effect of physical exercise on the phagocytic function of peritoneal macrophages from Swiss mice. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 1993.v. 16, p. 29-37,

GALBO, H. **Hormonal and metabolic adaption to exercise**. New York: Thieme Verlag, 1983.

HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B. K. Exercise and the immune system: a model of the stress response? **Immunology Today**, 1994. v. 15, p. 382-387,

ILBACK, N. G.; CRAWFORD, D. J.; NEUFELD, H. A.; FRIMAN, G. Does exercise stress alter susceptibility to bacterial infections? **Upsala Journal of Medical Science**, 1991.v. 96, n. 1, p. 63-68,

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2002. 767 p.

JONSDOTTIR, I. H.; HOFFMANN, P. The significance of intensity and duration of exercise on natural immunity in rats. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2000. v. 32, n. 11, p. 1908-1912.

JONSDOTTIR, I. H.; ASEA, A.; HOFFMANN, P.; DAHLGREN, U. I.; ANDERSSON, B.; HELLSTRAND, K.; THOREN, P. Voluntary chronic exercise augments *in vivo* natural immunity in rats. **Journal of Applied Physiology**, 1996. v. 80, n. 5, p. 1799-1803,

KJAER, M.; DELA, F. Endocrine responses to exercise. In: HOFFMAN-GOETZ, L. (Ed.). **Exercise and immune Function**. Boca Raton: CRC, 1996. p.1-20.

KUROKAWA, Y; SHINKAI, S; TORII, J *et al*. Exercise-induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and

lymphocytes subpopulations. **European Journal of Applied Physiology**. 1995; 71:245-252.

LACHMANN , PJ ; HOBART, MJ. C6–C7: A Further Complement Supergene. **The Journal of Immunology**, 1978, 120: 1781-1782.

LEANDRO, C; NASCIMENTO,E ; CASTRO, RM; DUARTE, JÁ; CASTRO, CMMB. Exercício Físico e Sistema Imunológico: mecanismos e interações. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**. 2002.8:309-314.

LIMA,O.A.; SOARES,J.B.;GRECO,J.B.; CANÇADO, J.R.. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 1992. p. 21-9- 21-12.

MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2000. v. 32, n. 7, p. S369-S376, (Supplement).

MALM, C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. **Sports Medicine**, 2004.v. 34, n. 9, p. 555-566,.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PRATA, A.; TOSTA, C. E. Phagocytic and bactericidal function of mouse macrophages to *Salmonella typhimurium* in human *Shistosoma mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 1992. v. 46, p. 132-136,

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I; MOTA, L. M.; AIRES, R. B.; JUNQUEIRA JÚNIOR, L. F. Differing phagocytic of monocytes and neutrophils in Chagas cardiopathy according to the presence or absence of congestive heart failure. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2004. v. 37, n. 6, p. 447-453,

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PEÇANHA, L. M. F.; SILVA FILHO, V. L.; CARDOSO, M. C. de A.; TOSTA, C. E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. Clinical and diagnostic laboratory immunology. **American Society for Microbiology**, 2003.v. 10, p. 1096-1102,.

NIELSEN, HG; LYBERG, T. Long-distance running modulates the expression of leucocyte and endothelial adhesion molecules. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2004:60:356-362.

NIEMAN, D. C. Exercise effects on systemic immunity. **Immunology and Cell Biology**, 2000a .v. 78, p. 496-501,.

NIEMAN, D. C. Exercise, the immune system, and infectious diseases. In. GARRET JR., W. E.; KIRKENDAL, D. T. (Ed.). **Exercise and sport science**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000b. p. 285-299.

NIEMAN, D. C. Is infection risk linked to exercise workload? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 2000c. v. 32, p. S406-S411,.

NIEMAN, D. C.; NEHLSSEN-CANNARELA, S. L. The immune response to exercise. **Seminars in Hematology**, 1994. v. 31, n. 2, p. 66-79,

NYDEGGER, U.E. *et al.* Polymorphonuclear leukocytes stimulation by immune complexes. Assessment by nitroblue tetrazolium reduction. *Europ. J. Immunol.*, 1973. v. 03, n.08, p. 465-470.

OTTAWAY, C. A.; HUSBAND, A. J. The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. **Immunology Today**, 1994. v. 15, n. 11, p. 511-507,

PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. **Lancet**, 1968.v. 7, n. 2, p. 532-534,

PEDERSEN, B. K.; HOFFMANN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, 2000.v. 80, n. 3, p. 1055-1081,

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sports Medicine**, 2000.v. 34, p. 246-251,

PEDERSEN, B. K.; OSSTROWSKI, H; RODHE, M.; BRUUNSGAARD, H. Nutrition, exercise and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, 1998. v. 57, p. 43-47,

RINCON, E. O. Physiology and biochemistry: influence of exercise on phagocytosis. **International Journal of Sports Medicine**, 1994. v. 15, p. S172-S178,

SHAW, D. R.; GRIFFIN JR., F. M. Antibody dependent and antibody independent phagocytosis. In: ADAMS, D. O.; EDELSON, P. J.; KOREN, H. (Ed.). **Methods for studying mononuclear phagocytes**. New York: Academic Press, 1981. p. 511-527.

SHEPHARD, R. J.; KAVANAGH, T.; MERTERS, D. J.; QURESHI, S.; CLARK, M. Personal health benefits of masters athletics competition. **British Journal of Sports Medicine**, 1995. v. 29, p. 35-40,

SILVA, PH; HASHIMOTO, Y. Interpretação Laboratorial do Leucograma. **Robe Editorial**. 1999.

SMITH, J. A. Exercise immunology and neutrophils. **Journal of Sports Medicine**, 1997.v. 18, p. S46-S55,

STERNBERG, E. M.; GOLD, P. W. The mind-body interaction in disease. **Scientific American**, 1997. v. 7, p. 8-15,

TABACHNICK BG, FIDELL LS. Using multivariate statistics. **New York: Harper& Row** 3 ed; 1996.

VOLEK, J. S.; KRAEMER, W. J.; BUSH, J. A.; INCLEDON, T.; BOETES, M. Testosterone and cortisol in relationship to dietary nutrients and resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, 1997. v. 82, p. 49-54,

VOLTARELLI, F. A.; GOBATTO, C. A.; MELLO, M. A. R. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2002. v. 35, p. 1389-1394.

WELTMAN, A. **The blood lactate response to exercise**. Current issues in exercise science. Leeds: Human Kinetics Europe, 1995. 128 p.

WOODS, J.A.; LU, Q.; CEDDIA, M.A.; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology and Cell Biology**, 2000.v. 78, p. 545-553,

ZIELINSKI, M. R.; MUENCHOW, M.; WALLIG, M. A.; HORN, P. L.; WOODS, J. A. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **Journal of Applied Physiology**, 2004.v. 96, n. 6, p. 2249-2256,