

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI -
UFVJM**

ROSALINA TOSSIGE GOMES

**O EXERCÍCIO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE INDUZ
DESEQUILÍBRIO REDOX EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO E REDUZ A RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS AO
ESTÍMULO SUPERANTIGÊNICO POR ALTERAÇÃO DA PROPORÇÃO DE
SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS.**

DIAMANTINA – MG

2015

ROSALINA TOSSIGE GOMES

**O EXERCÍCIO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE INDUZ
DESEQUILÍBRIO REDOX EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO E REDUZ A RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS
AO ESTÍMULO SUPERANTIGÊNICO POR ALTERAÇÃO DA PROPORÇÃO
DE SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Etel Rocha Vieira - UFVJM

Co-orientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim - UFVJM

DIAMANTINA – MG

2015

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

T715e
2015 Tossige-Gomes, Rosalina.
O exercício intervalado de alta intensidade induz desequilíbrio redox em células mononucleares do sangue periférico e reduz a resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo superantigênico por alteração da proporção de subpopulações linfocitárias / Rosalina Tossige-Gomes. – Diamantina : UFVJM, 2015.
81 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Etel Rocha-Vieira
Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Trigueiro Amorim

Dissertação (mestrado) –Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

1. Sistema imunológico. 2. Exercício intervalado de alta intensidade. 3. Desequilíbrio redox. 4. Função imunológica. 5. Proliferação de linfócitos. I. Rocha-Vieira, Etel. II. Amorim, Fabiano Trigueiro. III. Título.

CDD 613.7

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**O EXERCÍCIO INTERVALADO DE ALTA INTENSIDADE INDUZ
DESEQUILÍBRIO REDOX EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO E REDUZ A RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS AO
ESTÍMULO SUPERANTIGÊNICO POR ALTERAÇÃO DA PROPORÇÃO DE
SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS**

Rosalina Tossige Gomes

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 13 / 03 / 2015

Prof. André Talvani Silva Pedrosa – UFOP

Prof. Hércules Ribeiro Leite – UFVJM

Prof.^a Etel Rocha Vieira – UFVJM

Presidente

DIAMANTINA

2015

*A todos que despertaram em mim a curiosidade,
interesse e paixão pela pesquisa...*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar em todas as etapas da realização desse trabalho. Por me conceder saúde, força e sabedoria!

A minha querida orientadora, Etel Rocha Vieira, grande exemplo de competência, pela presença constante em todo o desenvolvimento do estudo, pela orientação, confiança, ensinamentos, preocupação, palavras amigas e tranquilizadoras, por acreditar sempre em mim e pela constante fonte de inspiração!

Ao professor Fabiano por estar sempre disposto a me ajudar no que precisei, pelas contribuições para realização desse trabalho.

A minha família que nunca mediu esforços para me ajudar! Meu pai Samuel e minha mãe Rozana pelo amor incondicional, pela força nos momentos difíceis e presença constante em minha vida. Aos meus irmãos Ana e Samuel pela amizade e apoio. Em especial a Rosaninha, minha companheira nos últimos meses em Diamantina, obrigada por tudo, com você foi mais fácil! Sem vocês não teria sido possível.

A toda minha família Tossige e Gomes, que estiveram presentes durante esta jornada.

Ao meu amor Marcelo, pelo companheirismo, pelas palavras tranquilizadoras, pela paciência em escutar todos os meus desabafos! Por ser meu grande incentivador em todas as etapas.

Ao amigo de mestrado e coleta Vinícius, por sua paciência nos dias difíceis e por estar sempre disposto a me ajudar. Obrigada por tudo!

A querida aluna de IC Karine, pelos incansáveis experimentos até de madrugada! Pela paciência e disponibilidade sempre que precisei.

Aos indispensáveis companheiros de laboratório, por sempre se mostrarem dispostos a me ajudar.

Aos amigos do LabImuno, que me receberam de braços abertos sempre que precisei!
Em especial a Val, uma mistura de amiga, irmã e mãe! Obrigada por tudo!

As pregas Lili, Talita e Nay, pelo companheirismo e amizade em todos os momentos!
Vocês foram as melhores amigas que eu poderia ter ganhado nesse mestrado!

Aos amigos pangarés Dirceu, Paula, Sueli, Camila e Sílvia pela maravilhosa
companhia e por se tornarem amigos tão especiais!

As amigas e companheiras da república Athenas! Pelo apoio, pela preocupação, por
sempre estarem apostos para o que precisei. Por serem minha família quando chegava em casa
cansada!

A amiga-irmã Fernanda pela paciência em me escutar repassando a matéria do
mestrado! Obrigada por ser tão presente, mesmo distante!

A galera massa que desde a época da prova me apoiaram em tudo! Vocês são
companheiros indispensáveis! Em especial ao Jonathan e sua família, que continuaram
comigo aqui em Diamantina. Obrigada por tudo meu amigo!

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela oportunidade de
realizar esta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas e a Sociedade
Brasileira de Fisiologia.

As minhas queridas crianças! Pelo sorriso sincero! Mesmo sem saber, me ajudaram
nas horas mais difíceis!

A Rosane, Hércules e Ana Cristina, obrigada pelas oportunidades! Por me fazer amar
cada dia mais a pediatria!

A todos os professores do departamento de fisioterapia. Pela amizade!

Aos voluntários que participaram deste trabalho, sem os quais ele não teria sido concluído. Obrigada pelo esforço nos testes e doação de sangue todas as vezes que foi preciso! Obrigada pela confiança e disponibilidade!

A minha querida Diamantina, por ser palco de todos os momentos! Por me acolher cada dia mais!

Aqueles que por ventura eu possa não ter mencionado, mas que foram também imprescindíveis na realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

O exercício intervalado de alta intensidade (HIIE) é caracterizado por breves e repetidas sessões de exercício intenso, intercaladas por períodos de repouso ou exercício de baixa intensidade. É uma modalidade de exercício que tem ganhado muito destaque nos últimos anos por ser uma modalidade de treinamento de baixo volume, embora pouco se saiba a respeito dos seus efeitos na função imune e no estado redox celular. Assim, este estudo avaliou o efeito de uma sessão de HIIE sobre o estado redox e a função de linfócitos em homens jovens sedentários. Esse trabalho foi dividido em dois estudos. No estudo 1 avaliou-se o efeito do HIIE sobre a proliferação e produção de citocinas e o estado redox de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). No estudo 2 avaliou-se o efeito do HIIE sobre a viabilidade e expressão de marcadores de ativação em linfócitos. As sessões de HIIE foram realizadas em bicicleta ergométrica, e consistiram em oito séries de 1 min a 90-100% de potência pico, com 75 segundos de recuperação ativa, a 30W, entre as séries. O sangue venoso foi colhido antes, imediatamente após e 30 minutos após a sessão de HIIE. Para avaliação da proliferação celular, por citometria de fluxo, as PBMC foram coradas com Carboxifluoresceína Succinimidil Ester (CFSE) (10 μ M) e estimuladas com o superantígeno SEB (100 ng/mL), durante 5 dias a 37° C, 5% de CO₂. A produção de IL-2 e IFN- γ em resposta a estimulação por SEB durante 18 horas, foi avaliada por ELISA. O estado redox celular foi avaliado pela mensuração da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), a concentração de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e conteúdo de glutatona reduzida (GSH). Para avaliação da viabilidade celular, por citometria de fluxo, as células foram marcadas com anticorpos anti-Anexina V FITC e iodeto de propídeo. Para análise da ativação dos linfócitos, por citometria de fluxo, as PBMC foram estimuladas com SEB por 18 horas, e em seguida marcadas com anticorpos fluorescentes

dirigidos contra CD4, CD8, CD19, CD25 e CD69. Os dados foram analisados utilizando os testes *one-way* ou *two-way* ANOVA, considerando $p \leq 0,05$. O HIIE promoveu redução na proliferação de linfócitos ($p = 0,01$), aumento na concentração de IL-2 ($p = 0,02$), e desequilíbrio redox nas PBMC, marcado por aumento nas concentrações de TBARS ($p = 0,02$) e diminuição na atividade da CAT ($p = 0,04$). O HIIE não alterou a viabilidade das PBMC, mas a frequência de células CD4 e CD19, positivas para os marcadores CD25 e CD69, foi menor após o exercício. Contudo, como foi observada redução na frequência de células CD4⁺ e CD19⁺, a redução da frequência de expressão de marcadores de ativação refletiu a redução do número de células, e não da resposta ao estímulo superantigênico. Nossos resultados mostram portanto, que apesar do HIIE promover desequilíbrio redox nas PBMC a resposta dos linfócitos ao estímulo superantigênico não é alterada. A redução da resposta proliferativa é, provavelmente, reflexo da alteração da distribuição das subpopulações linfocitárias em decorrência do HIIE.

Palavras-chave: sistema imunológico, exercício intervalado de alta intensidade, desequilíbrio redox, função imunológica, proliferação de linfócitos.

ABSTRACT

High-intensity interval exercise (HIIE) is characterized by brief and repeated intense exercise sessions, interspersed with periods of rest or low intensity exercise. This exercise modality has gained much attention in recent years, although little is known about its effects on immune function and cellular redox state. This study evaluated the effect of HIIE on the redox state and lymphocyte function in sedentary young males. This work was divided in two studies. The first study evaluated the effect of HIIE on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation, cytokine production and redox status. The second study evaluated the effect of HIIE on lymphocyte viability and activation markers expression. HIIE was performed on cycloergometer, and consisted of eight series of 1 min at 90-100% of peak power, with 75 seconds of active recovery, at 30W, between sets. Venous blood was collected before, immediately after and 30 minutes after HIIE. For cell proliferation evaluation by flow cytometry, PBMC were stained with Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) (10 mM) and stimulated with the superantigen SEB (100 ng/ml) for 5 days at 37° C, 5% CO₂. IL-2 and IFN- γ secretion in response to SEB stimulation for 18 hours was assessed by ELISA. The cellular redox status was assessed by measuring the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione content (GSH). To assess cellular viability, using flow cytometry, cells were labeled with anti-Annexin V-FITC and propidium iodide. To analyze lymphocyte activation, by flow cytometry, PBMC were stimulated with SEB for 18 hours, and then stained with fluorescent antibodies directed against CD4, CD8, CD19, CD25 and CD69. One-way or two-way ANOVA was employed for statistical analysis, with $\alpha \leq 0.05$. Lymphocyte proliferation was reduced ($p = 0.01$) after HIIE, despite increased IL-2 concentration ($p = 0.02$), and HIIE also induced PBMC redox imbalance characterized by

increased TBARS concentration ($p = 0.02$) and decreased CAT activity ($p = 0.04$). PBMC viability was not affected by HIIE, but the frequency of $CD4^+CD25^+/CD69^+$ and $CD19^+CD25^+/CD69^+$ cells in response to SEB stimulation was lower after exercise. However, as $CD4^+$ and $CD19^+$ frequencies were reduced, reduced activation markers expression was a consequence of cell number reduction. Our results therefore show that, although HIIE induced redox imbalance, lymphocyte response to superantigen stimulation was not affected. Reduced lymphocyte proliferative response after HIIE is probably due to modifications in lymphocyte subpopulations distribution.

Keywords: immune system, high-intensity interval exercise, redox imbalance, immune function, lymphocyte proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo da curva em “J”.....	10
Figura 2. Delineamento experimental.....	22
Figura 3. Estratégia de análise da proliferação celular pelo decaimento da fluorescência do CFSE.....	31
Figura 4. Estratégia de análise dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) por citometria de fluxo.....	37
Figura 5. Estratégia de análise para os marcadores de ativação de linfócitos.....	40
Figura 6. Efeito do HIIE sobre a proliferação de linfócitos induzida por SEB.....	44
Figura 7. Efeito do HIIE sobre a secreção de citocinas pelas PBMC em resposta a estimulação com SEB.....	45
Figura 8. Efeito do HIIE no estado redox das PBMC.....	46
Figura 9. Efeito do HIIE sobre a ativação das células T auxiliares por SEB.....	48
Figura 10. Efeito do HIIE sobre a ativação de células B por SEB.....	49
Figura 11. Efeito do HIIE sobre a ativação de células T citotóxicas pelo SEB.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações linfocitárias e marcadores de ativação celular.....	39
Tabela 2. Características físicas e fisiológicas dos voluntários.....	41
Tabela 3. Parâmetros fisiológicos e potência atingida dos voluntários durante o HIIE.....	42
Tabela 4. Efeito do HIIE sobre a contagem global e diferencial de leucócitos.....	43
Tabela 5. Efeito do HIIE sobre a viabilidade das PBMC.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSM	<i>American College of Sports Medicine</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
APC	Células apresentadoras de antígeno, do inglês <i>antigen presenting cells</i>
bpm	Batimentos por minuto
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAT	Catalase
CFSE	<i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i>
ConA	Concanavalina A
CTL	Citolítico
CTLA-4	Proteína associada a linfócito citolítico 4, do inglês
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Dietilenotriaminopentacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Erro padrão
ERNOs	Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos
FC	Frequência cardíaca
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, do inglês
FL1	Fluorescência 1
FL2	Fluorescência 2
FL3	Fluorescência 3

FSC	<i>Forward scatter lighth</i>
g	Gramas
xg	Força da gravidade
GLUT-4	Transportador de glicose do tipo 4, do inglês
GM-CSF	Fator de estimulação de macrófagos e granulócitos, do inglês
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIIE	<i>High intensity interval exercise</i>
HIIT	<i>High intensity interval training</i>
ICAM-1	Molécula Intercelular de Adesão 1, do inglês
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-8	Interleucina 8
IMC	Índice de massa corporal
IP	Índice de proliferação

ITRS	Infecção do trato respiratório superior, do inglês
kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
m ²	Metro ao quadrado
MDA	Malondialdeído
METS	Equivalentes metabólicos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês
min	Minuto
mL	Mililitros
ng	Nanograma
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanometro
NO [•]	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAR-Q	Questionário de prontidão para atividade física, do inglês
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico, do inglês
PBS	Tampão fosfato salina
PE	Ficoeritrina, do inglês
PE-Cy5	Ficoeritrina-cianina
PerCP	Proteína clorofila peridina
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogênio

PHA	Fitohemaglutinina, do inglês
PMA	Miristato acetato de forbol, do inglês
pré-ex	Pré-exercício
pós-ex	Pós-exercício
30 min pós-ex	30 minutos pós exercício
PSE	Percepção subjetiva de esforço
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
Se	Selênio
SEB	Superantígeno B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SOD	Superóxido dismutase
SSC	<i>Side scatter light</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês
TCR	Receptor de célula T, do inglês
Th1	Células T auxiliares do tipo 1
Th2	Células T auxiliares do tipo 2
TMB	3,3', 5,5' tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês
V β	Região variável da cadeia beta
VO ₂	Volume de oxigênio
VSAQ	<i>Veterans Specific Activity Questionnaire</i>
W	Watts
μ M	Micromolar
μ L	Microlitros

SUMÁRIO

1.0 Introdução.....	1
2.0 Revisão de literatura.....	4
2.1 O sistema imunológico e a resposta imune.....	4
2.2 A função imune e o exercício físico.....	8
2.3 Desequilíbrio redox induzido pelo exercício e seu impacto nas células do sistema imunológico.....	13
2.4 O exercício intervalado de alta intensidade.....	16
3.0 Objetivos.....	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4.0 Material e métodos.....	21
4.1 Voluntários	21
4.2 Delineamento do estudo.....	21
4.2.1 Avaliação inicial.....	23
4.2.1.1 Avaliação da composição corporal.....	23
4.2.1.2 Avaliação da capacidade aeróbica e potência máximas.....	24
4.3 Exercício experimental.....	26
4.4 Processamento das amostras.....	27
4.4.1 Contagem global e diferencial dos leucócitos.....	28
4.4.2 Obtenção das PBMC.....	29
4.4.3 Estudo 1 – Avaliação da proliferação celular.....	29
4.4.4 Estudo 1 – Análise da secreção de IL-2, IL-4 e IFN- γ	32
4.4.5 Estudo 1 – Análise do estado redox das PBMC.....	33
4.4.5.1 Determinação da concentração de TBARS.....	34

4.4.5.2 Determinação da atividade da SOD.....	34
4.4.5.3 Determinação da atividade da CAT.....	35
4.4.5.4 Determinação do conteúdo de GSH.....	35
4.4.6 Estudo 2 – Análise da morte celular por apoptose.....	36
4.4.7 Estudo 2 – Análise da ativação de linfócitos.....	37
4.5 Análise estatística.....	38
5.0 Resultados.....	41
5.1 Estudo 1 – Efeito do HIE sobre a função de linfócitos e estado redox das PBMC.....	42
5.2 Estudo 2 – Efeito do HIE sobre a expressão de marcadores de ativação celular.....	46
6.0 Discussão.....	51
7.0 Conclusão.....	59
8.0 Referências.....	60
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	78
ANEXO 3.....	79
ANEXO 4.....	80

1.0 Introdução

O sistema imunológico é composto por duas linhas de defesa principais, que atuam de forma coordenada e integrada a fim de proteger o organismo contra infecções e tumores, mantendo a integridade dos tecidos do hospedeiro. Estas duas linhas compreendem os componentes da imunidade inata e da imunidade adaptativa (SHEPHARD *et al*, 1994; MACKINNON, 1992). A resposta da imunidade adaptativa aumenta em magnitude e capacidade de defesa a cada exposição sucessiva a antígenos específicos. Esta compreende os linfócitos T e B e seus produtos solúveis, as citocinas e as imunoglobulinas. Os linfócitos T coordenam a resposta de muitos componentes de imunidade adaptativa e também mecanismos efetores da imunidade inata, através da liberação de citocinas (BONILLA e OETTGEN, 2010).

O exercício físico proporciona um desafio para a homeostase de todo o corpo. O sistema imune, como muitos outros sistemas fisiológicos, exibe perturbações substanciais em resposta a uma única sessão de exercício (MACKINNON, 1997; PYNE e GLEESON, 1998). Em contraste com a atividade física moderada, o exercício prolongado ou de alta intensidade provoca inúmeras alterações na imunidade que possivelmente refletem o estresse fisiológico. Os atletas que realizam regularmente exercícios extenuantes podem ter um risco aumentado de infecção do trato respiratório superior, durante períodos de treino e/ou competições, e até algumas semanas após os eventos competitivos (PETERS e BATEMAN, 1983; PETERS, 1990). Neste contexto, tem sido proposto que alterações da função imune poderiam, pelo menos em parte, estar relacionadas à maior susceptibilidade a infecções após exercícios extenuantes, caracterizando uma imunossupressão temporária (KOHUT *et al*, 2001).

É sabido que exercícios de alta intensidade induzem uma maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode resultar em estresse oxidativo (JI, 1999), uma condição decorrente do desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade antioxidante

celular (CODONER-FRANCH *et al*, 2011). As células do sistema imune parecem particularmente sensíveis a variações do estado redox. Indivíduos idosos, com reduzida atividade de enzimas antioxidantes e níveis aumentados de danos oxidativos em linfócitos, apresentam, por exemplo, diminuição da resposta proliferativa de linfócitos a mitógenos, e da secreção de citocinas (DE LA FUENTE, HERNANZ e VALLEJO, 2005). Assim, embora se saiba que o exercício de alta intensidade é marcado por uma imunossupressão temporária e, concomitantemente, por um quadro de estresse oxidativo, o que pode comprometer a viabilidade e função de linfócitos, até o momento nenhum estudo investigou estes dois parâmetros simultaneamente em resposta ao exercício.

Nos últimos anos o exercício intervalado de alta intensidade (HIIE, do inglês *high intensity interval exercise*) tem ganhado destaque como modalidade de treinamento para não atletas. Além de promover adaptações semelhantes às aquelas observadas pelo exercício aeróbico convencional (no qual o indivíduo se exercita a 55%-65% do VO₂max, por um intervalo médio de tempo de 60 a 120 minutos), como a biogênese de mitocôndrias e a indução da atividade de enzimas oxidativas (GIBALA *et al*, 2006; GIBALA *et al*, 2008 e LITTLE *et al*, 2010), no treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, do inglês *high intensity interval training*) as adaptações ao treinamento ocorrem em resposta a um volume menor de treino. Em uma sessão de HIIE o indivíduo realiza diversas séries de um determinado exercício, a uma intensidade maior (usualmente a 90% do VO₂max) por um curto período de tempo, separadas por poucos minutos de repouso ou por exercício de baixa intensidade durante o período de recuperação.

A importância da atividade física para melhorar a saúde é clara e bem descrita na literatura. Contudo, apesar de evidências científicas mostrarem que a prática de atividade física tem efeito na prevenção de doenças crônicas, a maior parte da população não consegue atender as diretrizes mínimas de atividade física necessárias à promoção de saúde que

corresponde a 30 a 60 minutos de exercício de moderada intensidade 5 vezes por semana (KORKIAKANGAS *et al*, 2009). A principal razão para a prática não regular de atividade física é a falta de tempo (GIBALA *et al*, 2012).

O HIIE tem mostrado ser uma alternativa para o problema da reduzida disponibilidade de tempo para a prática regular de atividade física. Porém, o HIIE, por ser um exercício de alta intensidade, pode levar ao desequilíbrio redox e consequente alteração da função celular no sistema imune. Dessa forma, este trabalho avaliou o efeito de uma sessão aguda de HIIE na função e desequilíbrio redox em células mononucleares do sangue periférico em homens jovens não treinados.

2.0 Revisão de literatura

2.1 O sistema imunológico e a resposta imune

O sistema imunológico é composto por duas linhas de defesa, que atuam de forma coordenada e integrada, a fim de proteger o organismo contra infecções e tumores, mantendo a integridade dos tecidos do hospedeiro. Estas duas linhas compreendem os componentes da imunidade inata e da imunidade adaptativa (SHEPHARD *et al*, 1994; MACKINNON, 1992).

A imunidade inata consiste na defesa inicial contra micro-organismos e moléculas expressas pelas células lesionadas do hospedeiro. Para isso, utiliza mecanismos de defesa celulares e bioquímicos, que estão presentes antes de qualquer infecção e prontos para responder rapidamente. O seu repertório de receptores para detectar patógenos invasores é pequeno, porém esse número limitado visa componentes microbianos que são comuns em grandes grupos de patógenos. Além disso, a imunidade inata desempenha um papel central na ativação da resposta imune adaptativa, o que é crucial para o controle das infecções. Participam da imunidade inata as células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células *natural killer* (NK) (revisado por TURVEY e BROIDE, 2010).

A imunidade adaptativa possui uma grande especificidade para moléculas distintas e sua resposta aumenta em magnitude e capacidade de defesa a cada exposição sucessiva a antígenos específicos. Os principais componentes da imunidade adaptativa são os linfócitos T e B, e seus produtos secretados: anticorpos e citocinas (revisado por BONILLA e OETTGEN, 2010).

Os linfócitos B reconhecem antígenos e produzem anticorpos, enquanto os linfócitos T reconhecem os antígenos e ajudam os fagócitos a destruí-los ou matam diretamente as células infectadas. Os linfócitos T reconhecem antígenos ligados às proteínas do hospedeiro denominadas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, *major histocompatibility complex*, MHC) que são expressas na superfície das células nucleadas. Os

linfócitos T são divididos funcionalmente em células T auxiliares (*helper* – T CD4⁺) e citotóxicos (CTL – T CD8⁺) (revisado por BONILLA e OETTGEN, 2010). Os linfócitos T CD4⁺ respondem a estimulação antigênica produzindo proteínas, denominadas citocinas, que estimulam a proliferação e a diferenciação das próprias células T e ativam outras células, inclusive células B e macrófagos. Já os linfócitos T CD8⁺ destroem as células que exibem antígenos estranhos, em um mecanismo dependente de contato (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

A interleucina-2 (IL-2), o interferon-gama (IFN- γ) e a interleucina-4 (IL-4) são citocinas produzidas principalmente por linfócitos T, células NK e mastócitos, que desempenham um papel importante tanto na imunidade inata como na adaptativa (ROCHA *et al*, 1989; DE MAEYER e DE MAEYER-GUINARD, 1998). Os linfócitos T auxiliares são classificados de acordo com o padrão de citocinas que secretam, resultando em uma resposta mediada por célula (Th1) associada à secreção de IL-2, IL-12 e IFN- γ , sendo importantes contra patógenos intracelulares, ou uma resposta imune humoral (Th2), associada à secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, sendo efetiva na proteção contra helmintos, principalmente (ANNUNZIATO e ROMAGNANI, 2009).

A ativação de células T virgens em resposta a um antígeno, assim como sua subsequente proliferação e diferenciação, constitui uma resposta imune primária mediada por células (MOSMANN *et al*, 1997; TSENG e DUSTIN *et al*, 2002). A ativação da célula T por antígeno pode resultar em várias respostas funcionais, incluindo ativação, anergia e apoptose. O sinal primário para a ativação do linfócito T é a ligação e reconhecimento, pelo complexo do receptor de célula T (do inglês *T cell receptor*, TCR) associada a molécula de superfície CD3 (complexo TCR/CD3), do peptídeo antigênico ligado a molécula de MHC, presente na superfície das células apresentadoras de antígeno (do inglês, *antigen presenting cell*, APC). Entretanto, apenas o reconhecimento do antígeno pela célula T não é suficiente para uma

ativação adequada, e pode levar a célula T ao estado de anergia (SCHWARTZ *et al*, 1989; SCHWARTZ, 1990). Para a completa ativação do linfócito T e sua proliferação, sinais adicionais fornecidos pelas células apresentadoras de antígeno, e moléculas co-estimulatórias presentes nestas, são necessários (HARDING *et al*, 1992; SCHWARTZ, 1992).

A interação de B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, com as moléculas CD28 e CTLA-4, fornecem os sinais co-estimulatórios para a adequada ativação das células T, e outras interações, incluindo as interações entre moléculas de adesão, como os pares ICAM-1/LFA-1 e LFA-3/CD2, também estão envolvidas na adequada ativação das células T (BIERER *et al*, 1988; KOYASU *et al*, 1990; VAN SEVENTER *et al*, 1990).

Após a ativação das células T o CD69 é uma das primeiras glicoproteínas de superfície celular expressa (TESTI *et al*, 1989). A expressão de CD69 é induzida por interação do complexo TCR/CD3, e, depois de expressa, acredita-se estar envolvida na transmissão de sinais co-estimuladores que conduzem à proliferação celular, a secreção de citocinas e citotoxicidade (MORETTA *et al*, 1991), embora estudos recentes questionem o papel proposto para o CD69 (ALARI-PAHISSA *et al*, 2012). A expressão desta glicoproteína tem sido utilizada como indicador/marcador precoce de ativação, já que linfócitos T e B do sangue periférico, não estimulados, normalmente não expressam CD69, e apenas um pequeno número de células circulantes expressam baixos níveis deste marcador (BORREGO *et al*, 1999).

O encontro inicial com o antígeno específico, na presença do sinal co-estimulatório adequado, desencadeia a entrada da célula T na fase G1 do ciclo celular e, ao mesmo tempo, induz a síntese de IL-2, juntamente com a cadeia alfa de seu receptor (CD25). A expressão de CD25 permite a constituição do receptor de alta afinidade de IL-2 (IL2R $\alpha\beta\gamma$) e a expansão clonal de células T ativadas dependerá da expressão deste receptor (BARTEN *et al*, 2001).

A IL-2 é uma importante citocina produzida pelas células T logo após a sua ativação, principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, e é conhecida como fator de crescimento de células T. É produzida geralmente de 2 a 3 horas após o reconhecimento do antígeno e age nas mesmas células que a produzem ou nas células adjacentes (GANGULY *et al*, 2001).

As células ativadas se dividem de duas a três vezes por dia, por vários dias, proporcionando uma quantidade significativa de células filhas, que são essenciais para erradicação da infecção, sendo assim a proliferação ou de células T uma etapa crucial do estabelecimento da resposta imune adaptativa (GAFFEN, 2001; ZHOU *et al*, 2002). A proliferação dos linfócitos, em resposta ao reconhecimento do antígeno, é um evento inicial que reflete o grau de ativação das populações linfocitárias, sendo um importante episódio junto a complexa rede de estímulos imune-mediados (BOYMAN *et al*, 2007). O resultado dessa proliferação é a expansão clonal, que cria um *pool* de linfócitos virgens específicos para o antígeno. Após a exposição ao antígeno, a frequência das células aumentam T aumentam: células CD8⁺ podem aumentar sua frequência cerca de 3 a 10 vezes, enquanto as CD4⁺ de 100 a 1.000 vezes (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2011).

Ao final da fase proliferativa, após 4 a 5 dias, as células T ativadas se diferenciam em células T efetoras, que podem sintetizar todas as moléculas necessárias para suas funções específicas. Após a diferenciação, as células T sofrem algumas modificações, uma delas é a capacidade de responder ao antígeno específico sem a necessidade de co-estimulação, aumentando assim a velocidade de resposta (GUDMUNSDOTTIR, WELLS e TURKA, 1999).

Para estudo *in-vitro* da função dos linfócitos, é necessário um estímulo que mimetize o papel do antígeno e estimule as células a passarem pelas etapas cruciais, relatadas acima. Os superantígenos são um grupo heterogêneo de toxinas bacterianas, proteínas virais e antígenos próprios endógenos, que têm em comum a capacidade de induzir uma forte ativação de

linfócitos T (SCHLIEVERT, 1993). Os superantígenos produzidos por várias cepas de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* são os mais estudados. Os superantígenos diferem em vários aspectos dos antígenos peptídicos convencionais. Os superantígenos se ligam a regiões invariantes da molécula de MHC de classe II, fora da fenda de ligação do antígeno (FLEISCHER *et al*, 1989; DELLABONNA *et al*, 1990; LANDO *et al*, 1993) e são apresentados aos linfócitos T como proteínas intactas não processadas. Os linfócitos T interagem com os superantígenos pelo domínio V β do TCR, independente da sua especificidade antigênica (KAPLER *et al*, 1989; WHITE *et al*, 1989; PULLEN *et al*, 1990). O SEB é um superantígeno produzido por *S. aureus* e se liga a linfócitos T que expressam as cadeias V β 1.1, 3.2, 6.4 e 15.1. Isto resulta na estimulação de uma grande fração da população de células T, 5 a 30%, comparado com apenas uma em 10⁵ ou 10⁶ células T durante a ativação por antígenos convencionais (FULLER, 1998; HERMANN *et al*, 1992).

Como ocorre para os antígenos convencionais, a ativação de células T por SEB depende não só de sua ligação a cadeia V β do TCR, mas também da interação de moléculas co-estimulatórias e seus ligantes e da interação entre moléculas de adesão (PARRA *et al*, 1997; GJORLOFF *et al*, 1992; FISCHER *et al*, 1992). Portanto, como o SEB mimetiza a ação de antígenos convencionais, porém estimulando uma maior quantidade de células, é possível avaliar, por meio da estimulação com os superantígenos, a função que os linfócitos desempenham nas etapas iniciais de estabelecimento da resposta imune adaptativa.

2.2 A função imune e o exercício físico

O exercício físico proporciona um desafio para a homeostase de todo o corpo. O sistema imune, como muitos outros sistemas fisiológicos, exhibe perturbações substanciais em resposta a uma única sessão de exercício como também ao treinamento físico (MACKINNON, 1997; PYNE e GLEESON, 1998).

Tem sido sugerido que a relação entre exercício e a imunidade segue uma curva em J, onde o exercício físico moderado ou regular melhora a capacidade de resistir a infecções (NIEMAN *et al*, 1993; NIEMAN *et al*, 1998; NIEMAN *et al* 2004) e o exercício de alta intensidade reduz a imunidade (NIEMAN *et al*, 1990; NIEMAN *et al*, 1994) (figura 1).

Em uma meta-análise recente, onde foram avaliados estudos relatando o efeito do exercício, atividade física, esporte e treinamento sobre a susceptibilidade a infecções do trato respiratório superior, esta relação em J foi demonstrada. Os 30 estudos avaliados incluíram 8.595 atletas, sendo 5.471 corredores, 2.803 nadadores e 1.798 não-atletas, e demonstraram que existe, de fato, uma relação inversa entre as cargas de exercício e a função do sistema imunológico (MOREIRA *et al*, 2009). A prática de atividade física moderada pode aumentar a função imunológica acima dos níveis sedentários, enquanto que quantidades excessivas ou prolongadas prejudicam, temporariamente, a competência imunológica (MOREIRA *et al*, 2009). Durante este período, de reduzida competência imunológica, conhecido como período de “janela imunológica”, o organismo estaria mais susceptível a patógenos, o que explicaria a associação entre as alterações fisiológicas provocadas no sistema imune após sessões de exercício longa duração e a aumentada susceptibilidade à infecção do trato respiratório superior (ITRS) (NIEMAN e PEDERSEN, 1999; PEDERSEN *et al*, 1994).

Desde a proposição desta teoria, diversos estudos têm demonstrado alterações no número, bem como na funcionalidade dos leucócitos circulantes (NIEMAN, 1997; MACKINNON, 2000; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000); assim como nas concentrações séricas das citocinas pró-inflamatórias, após exercícios contínuos de alta intensidade ou de longa duração (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; PEDERSEN e FISCHER, 2007).

Risco de ITRs

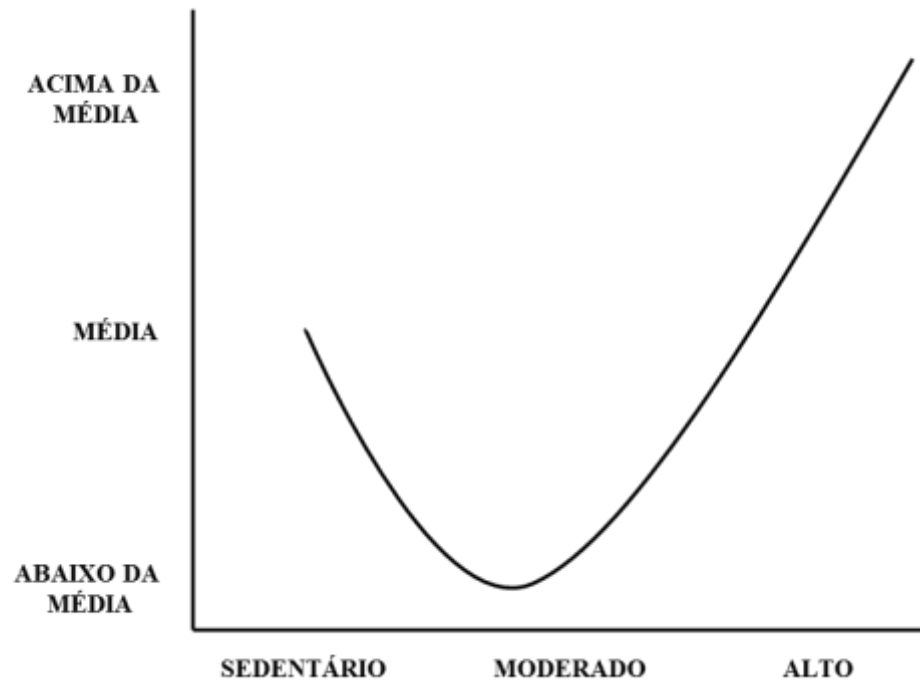


FIGURA 1. Modelo da curva em “J”. Relação entre carga de exercício e risco de infecções no trato respiratório superior (adaptado NIEMAN, 1994).

Vários estudos com modelos animais e humanos demonstraram aumentos agudos na contagem leucocitária durante e após exercícios em intensidades submáximas (aproximadamente 60% VO_2max) até máximas, caracterizando os quadros denominados leucocitose, linfocitose, neutrocitose e monocitose, definidos como o aumento da contagem absoluta dos leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes (NIEMAN e PEDERSEN, 1999; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; PRESTES *et al*, 2006; FERREIRA *et al*, 2007; PRESTES *et al*, 2007; PRESTES *et al*, 2008). Particularmente em relação aos linfócitos, em geral, protocolos de exercício aeróbico agudo provocam alteração na contagem e distribuição das subpopulações linfocitárias no sangue. No início, há uma rápida mobilização de linfócitos para o sangue, resultando em uma contagem elevada (linfocitose) (PEDERSEN e TOFT, 2000). Em particular as células NK e T $CD8^+$ parecem aumentar mais, quando comparados com células T $CD4^+$ e células B (PEDERSEN e TOFT,

2000). Durante as fases iniciais de recuperação, normalmente 30 minutos a 2 horas após a cessação do exercício aeróbico de diferentes durações, a contagem de linfócitos no sangue cai abaixo dos valores de repouso e retorna naturalmente aos valores normais dentro de 6 a 24 h (PEDERSEN e TOFT, 2000).

Estas alterações podem ser atribuídas à eliminação através de morte celular programada (apoptose), ao movimento de células a partir da circulação (migração), ou uma combinação de ambos (NAVALTA, SEDLOCK e PARK, 2007). Isso provavelmente ocorre porque os linfócitos ficam expostos a um meio de sinais pró-apoptóticos que incluem o aumento da concentração de glicorticóides, catecolaminas, citocinas inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio (PEDERSEN e TOFT, 2000).

Em relação ao efeito do exercício sobre a função de linfócitos, Macneil *et al* (1991) avaliaram o efeito da intensidade e duração do exercício na proliferação de linfócitos. No estudo foram utilizados diferentes protocolos de exercício em cicloergômetro (30 minutos a 65% VO_2max , 60 minutos a 30% VO_2max , 60 minutos a 75% VO_2max e 120 minutos a 65% VO_2max), em três grupos de homens com níveis de condicionamento físico diferentes (baixo, moderado e alto, VO_2max $44,9 \pm 1,5$; $55,2 \pm 1,6$ e $63,3 \pm 1,8$ mL.O₂/kg/min, respectivamente) e grupo controle, que foi composto por um grupo misto ($VO_2max = 52,4 \pm 2,3$ mL O₂/kg/min). A proliferação de linfócitos foi avaliada por meio da incorporação de timidina radiomarcada em resposta ao estímulo do mitógeno concanavalina A (ConA), uma lectina. Os resultados mostraram diminuição na proliferação de linfócitos 2 horas após o exercício em todos os grupos, o que retornou aos valores pré-exercício em 24 horas. Estes dados sugerem que uma sessão única de exercício contínuo, prolongado, reduz temporariamente a função dos linfócitos em homens, e que esse efeito ocorre independentemente do nível de aptidão física.

Nieman *et al* (1994) também avaliaram o efeito de duas sessões de exercício contínuo, um de intensidade moderada (45min, 50% do VO_2max) e outro de alta intensidade (45 min,

80% VO_2max), na resposta proliferativa de linfócitos de indivíduos jovens e bem condicionados (VO_2max de $66,0 \pm 1,9 \text{ mL O}_2/\text{kg}/\text{min}$) estimulados, *in vitro*, por ConA. A resposta proliferativa dos linfócitos ao estímulo por ConA foi menor 1 e 2 h após o exercício de alta intensidade, comparada com a situação pré-exercício.

De maneira similar, Vider *et al* (2001) observaram diminuição da resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo por ConA e fitohematoglutina (PHA) em indivíduos jovens ($22,21 \pm 5,58$ anos), saudáveis e treinados ($\text{VO}_2\text{max} = 69,79 \pm 8,22 \text{ mL O}_2/\text{kg}/\text{min}$), que realizaram exercício em esteira até a exaustão. Porém as células que foram estimuladas com PHA retornaram aos valores basais de proliferação 30 minutos após o exercício, já as estimuladas com ConA mantiveram a proliferação diminuída após esse tempo. Também Green, Rowbottom e Mackinnon (2003) relataram redução na resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo por PHA em indivíduos jovens (32 ± 8 anos) e treinados ($\text{VO}_2\text{max} = 68 \pm 4 \text{ mL O}_2/\text{kg}/\text{min}$), após 60 minutos de corrida em esteira, a 95% do VO_2max . Porém, foi observado redução significativa no percentual das células T CD3^+ , e quando avaliou-se a proliferação celular somente nessa subpopulação não houve efeito do exercício na resposta proliferativa de linfócitos, indicando que a diminuição da proliferação foi decorrente da redução dos linfócitos T em circulação após o exercício.

Outra maneira de avaliar a função dos linfócitos em resposta ao exercício é mensurar a expressão de marcadores de ativação, como por exemplo o CD69 e o CD25, visto que esse evento precede a proliferação celular (BARTEN *et al*, 2001). Uma série de estudos que avaliaram o efeito do exercício agudo contínuo, de longa duração, na ativação de linfócitos em resposta a estimulação com mitógenos, determinaram a frequência de células T que expressam o marcador de ativação precoce CD69 (RONSEN *et al*, 2001; VIDER *et al*, 2001; GREEN, ROWBOTTOM e MACKINNON *et al*, 2003). Alguns autores sugerem que a frequência de expressão de CD69 nas células T estimuladas por mitógeno não se altera após

uma sessão de exercício agudo intenso (70% VO₂max) com duração de 1 h (RONSEN *et al*, 2001; GREEN, ROWBOTTOM E MACKINNON, 2003). Já Vider *et al* (2001) demonstraram diminuição na percentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam CD69 imediatamente após o exercício exaustivo (corrida até a exaustão voluntária). No entanto, a frequência de células CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ retornou aos valores pré-exercício após 30 min de recuperação do exercício.

É sugerido que a o risco aumentado de ITRS em decorrência da realização de exercício físico intenso esteja relacionado a uma resposta aumentada das citocinas ao desafio antigênico (GLEESON *et al*, 2013). Como o exercício prolongado parece suprimir a função das células T (TVEDE *et al*, 1989; NIEMAN *et al*, 1994) e NK (PEDERSEN *et al*, 1988; PEDERSEN *et al*, 1990; PEDERSEN, 1991; TVEDE *et al*, 1993), pode haver comprometimento da produção de citocinas por estas células após o exercício. Estudos mostram diminuição na concentração de IL-2 e IFN- γ , no sobrenadante de culturas celulares estimuladas, *in vitro*, por mitógeno após uma sessão de exercício contínuo de longa duração (LEWICKI *et al*, 1988). Weinstock *et al* (1997) avaliaram a produção de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico após teste ergométrico exaustivo, com tempo médio de duração de 68 minutos, em 15 atletas. Ele observou diminuição de IFN- γ em resposta ao estímulo por lipopolissacarídeo (LPS), e de IL-2, quando as células foram estimuladas com PHA, e aumento de IL-2 quando estimuladas com ConA.

2.3 Desequilíbrio redox induzido pelo exercício e seu impacto nas células do sistema imunológico

O termo espécies reativas refere-se a uma série de compostos de natureza radicalar e não radicalar, centradas no oxigênio ou no nitrogênio. As principais espécies reativas de oxigênio (EROs) radicalares são o ânion superóxido (O₂^{•-}) e o radical hidroxil (OH[•]) e as não radicalares são representadas pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As espécies reativas de

nitrogênio (ERNs) incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peroxinitrito (ONOO^{\ominus}) (HOLLIWELL e CROOS, 1994).

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ERONs) desempenham duplo papel no organismo: em baixas ou moderadas concentrações participam de processos fisiológicos, como os mecanismos de defesa dos fagócitos contra agentes infecciosos, a indução da resposta mitogênica, o controle do tônus vascular, entre outros (LILIUS e MARNILA, 1992, HEHNER *et al*, 2000, BURKE e WOLIN, 1987). Quando há, porém, uma produção excessiva de ERONs, e uma deficiência nos sistemas antioxidantes em lidar com essa situação, estas reagem com as biomoléculas celulares, na tentativa de parear seus elétrons e restaurar sua estabilidade (RÁDAK *et al*, 2001). Isso modifica e deixa as biomoléculas instáveis, inibindo seu papel fisiológico e, também, causa perturbação do controle e da sinalização redox (FISCHER-WELLMAN e BLOOMER, 2009; RÁDAK *et al*, 2001), situação denominada desequilíbrio redox ou estresse oxidativo (SIES, 1997).

Em geral, o corpo possui reservas de antioxidantes adequadas para lidar com a produção de ERONs sob condições fisiológicas (WAYNER, 1987; BANERJEE *et al*, 2003). Dois mecanismos protetores endógenos funcionam como uma unidade para controlar os efeitos de ERONs: enzimáticos e não-enzimáticos, ambos encontrados nos meios intra e extracelulares (POWERS e LONNON, 1999).

As enzimas consideradas antioxidantes primárias são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) (JI, 1998; POWES e LONNON, 1999). A SOD é a primeira linha de defesa enzimática e constitui a defesa celular contra o radical superóxido, sendo capaz de catalisar a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ para formar água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2). A principal função da CAT é catalisar a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A GPX é, assim como a CAT, a enzima responsável por reduzir H_2O_2 à água. Ela utiliza a glutathiona em sua forma reduzida (GSH) como doador de elétron e requer

selênio (Se) como co-fator (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Já os antioxidantes não-enzimáticos incluem a glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), α -Tocoferol (vitamina E) e ácido úrico (SIES e STAHL, 1995; WAYNER *et al*, 1987), dentre outros.

A formação de ERONs ocorre no metabolismo celular normal, entretanto, pode estar aumentada no exercício físico, promovendo assim o desequilíbrio redox (SOUZA, OLIVEIRA e PEREIRA, 2005; BLOOMER *et al*, 2005; PASCHALIS *et al*, 2007; CUEVAS *et al*, 2005; BLOOMER, 2007). Dillart *et al* (1978), foram os primeiros a mostrarem que o exercício físico é capaz de levar a um estado de desequilíbrio redox. Os autores avaliaram o volume de pentano expirado, que é um indicador de peroxidação lipídica, em indivíduos submetidos a 60 minutos de exercício a 50% do consumo máximo de oxigênio em bicicleta ergométrica. Foi observado aumento de 1,8 vezes no pentano expirado, demonstrando aumento da peroxidação lipídica durante o exercício. Já Davies *et al* (1982), demonstraram, por meio da técnica de ressonância paramagnética de elétrons, aumento na amplitude de sinal de radicais livres no músculo esquelético e no fígado de ratos submetidos a exercício exaustivo em esteira, e propuseram que a contração do músculo esquelético levava ao aumento da produção de radicais livres e que tal situação poderia ser prejudicial aos tecidos.

As células do sistema imune parecem particularmente sensíveis a variações do estado redox. Indivíduos idosos, com reduzida atividade de enzimas antioxidantes e maior dano oxidativo em linfócitos, apresentam, por exemplo, diminuição da resposta proliferativa de linfócitos a mitógenos, e da secreção de citocinas (DE LA FUENTE, HERNANZ e VALLEJO, 2005).

A literatura mostra que o estresse oxidativo, causado pelo exercício contínuo, prolongado, induz a apoptose de linfócitos, provavelmente assim reduzindo sua função (WANG e HUANG, 2005). Niess *et al*, (1996) avaliaram a concentração plasmática de malondialdeído (MDA) e a ocorrência de danos oxidativos no DNA de leucócitos em 6

homens treinados e 5 não treinados, após exercício exaustivo em esteira. Eles observaram, no grupo de indivíduos não treinados, maior concentração de MDA no repouso e 15 minutos após o exercício, e maior ocorrência de dano ao DNA nos leucócitos circulantes após o exercício exaustivo.

Ferrer *et al* (2009) avaliaram o efeito de uma sessão de exercício de natação (70 a 80% da capacidade máxima, por 1 hora) na atividade de enzimas antioxidantes e marcadores de desequilíbrio redox em linfócitos. Foi observado aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em linfócitos após o exercício, embora nenhum efeito tenha sido observado na atividade das enzimas antioxidantes destas células.

O aumento da concentração de TBARS em linfócitos também foi relatado por Sureda *et al* (2009) após uma sessão de treino ($75,6 \pm 4,8\%$ do período de treino na zona de frequência cardíaca correspondente a 90% ou mais do $VO_2\text{max}$) de futebol. Tauler *et al* (2006) mostraram que uma prova de ciclismo em terreno montanhoso (171,8 km) em ciclistas, do sexo masculino, jovens ($25,2 \pm 2,3$ anos), saudáveis e treinados ($VO_2\text{max} = 78,4 \pm 4,9$ mL O_2 /kg/min), induziu linfopenia significativa e estresse oxidativo em linfócitos, marcado pelo aumento da concentração de proteína carbonílica, vitamina E e aumento da atividade da GPX, GSH e SOD.

Assim, embora se saiba que o exercício contínuo, prolongado é marcado por uma imunossupressão temporária e, concomitantemente, por um quadro de estresse oxidativo, o que pode comprometer a viabilidade e função de linfócitos, até o momento nenhum estudo investigou a ocorrência de estresse oxidativo e a função nestas células após o exercício intervalado de alta intensidade.

2.4 O exercício intervalado de alta intensidade

O exercício intervalado de alta intensidade é caracterizado por breves e repetidas sessões de exercício intenso (próximo a 100% da capacidade máxima do indivíduo), intercaladas por períodos de repouso ou exercício de baixa intensidade (GIBALA e MACGEE, 2008; GILLEN e GIBALA, 2014). Investigações demonstram que o treinamento com o HIIE (HIIT, do inglês *high intensity interval training*) desencadeia adaptações musculares e vasculares similares às observadas em resposta ao treinamento de *endurance*, porém com um menor volume de treinamento (GIBALA *et al*, 2006; BURGOMASTER *et al*, 2006; 2008). Entre as adaptações desencadeadas pelo treinamento com o HIIT encontram-se o estímulo a biogênese mitocondrial e a atividade de enzimas oxidativas (LITTLE *et al*, 2010; GIBALA *et al*, 2006; 2008), a melhora da rigidez arterial periférica, aumento da expressão de GLUT-4 e aumento da sensibilidade a insulina (LITTLE *et al*, 2010).

Por promover adaptações semelhantes ao treinamento de *endurance*, porém com menor volume de treinamento, o HIIT tem recentemente ganhado popularidade, entre os não atletas, como uma intervenção tempo-eficiente para melhora do condicionamento aeróbico em poucas sessões de treinamento (BURGOMASTER *et al*, 2005; 2006; LITTLE *et al*, 2010). O HIIT, por ser de baixo volume, ou seja, as sessões de exercício duram menos de 30 minutos, representa uma alternativa ao exercício de *endurance*, para melhorar a saúde e diminuir o risco de doenças crônicas, uma vez que, a falta de tempo para a prática regular de exercícios físicos é a barreira mais citada pela população em geral (GODIN *et al*, 1994; TROST *et al*, 2002). Considerando que a progressão das doenças cardiovasculares é atenuada pelo treinamento físico regular, especialmente o treinamento de *endurance*, e que o sedentarismo é o principal fator de risco modificável para doenças cardiovasculares pelo treinamento (CELERMAJER *et al*, 1994; SUWAIDI *et al*, 2000), o HIIT pode ser uma opção para promoção de saúde, por estimular maior aderência a prática regular de exercício físico.

Evidências demonstram que o HIIIE, assim como o exercício contínuo prolongado, também promove desequilíbrio redox. Bogdanis *et al* (2013) avaliaram o efeito agudo e crônico do exercício intervalado de alta intensidade em marcadores de estresse oxidativo no soro em homens jovens ($24,3 \pm 1,4$ anos) e fisicamente ativos. O protocolo, realizado em cicloergômetro e baseado no teste de *Wingate* ($0,075\text{kg/kg}$ de massa corporal), consistiu de 4 estímulos de 30 segundos, intercalados por recuperação ativa de 4 minutos com uma carga baixa (50W). O efeito agudo mostrou aumento da concentração de proteína carbonílica e de TBARS e da capacidade antioxidante total imediatamente após, 24 e 48 horas após o exercício. Também foi observado aumento da atividade de GPX 24 e 48 horas após e CAT imediatamente após e 24 após o exercício.

O efeito do HIIIE sobre parâmetros da função imune também têm sido investigados, e, considerando que embora seja este um exercício de curta duração, mas de alta intensidade, é razoável hipotetizar que, de alguma maneira, o HIIIE altere a função imune. Apenas recentemente estudos nesta área, envolvendo o HIIIE, têm sido conduzidos. Zwetsloot *et al* (2014) avaliaram o efeito agudo e crônico do HIIIE na concentração sistêmica de citocinas e quimiocinas em homens jovens (22 ± 2 anos) e fisicamente ativos ($\text{VO}_2\text{max} = 49,2 \pm 2,6$ mL $\text{O}_2/\text{kg}/\text{min}$). O protocolo foi realizado em cicloergômetro e consistiu em 8 estímulos de 60 segundos a 100% da potência máxima, intercalados por períodos de recuperação ativa, de 75 segundos, a 50W. Foi observado aumento nas concentrações plasmáticas de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1 após o exercício agudo. Não foram observadas alterações nas concentrações plasmáticas de IFN- γ , IL-1 β e fator de estimulação de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) logo após o exercício.

Apenas Fischer *et al* (2011) avaliaram o efeito de 3 sessões de HIIIE no estresse oxidativo de linfócitos, objetivando identificar respostas ao estresse imunológico e oxidativo agudo e ao treinamento. Eles observaram aumento da atividade das enzimas antioxidantes

SOD, CAT e GPX em linfócitos após a sessão de exercício e também aumento do TBARS no plasma imediatamente após o HIIE. A viabilidade celular apresentou diminuição após 3 horas ao exercício em relação à imediatamente após e 24 horas após. Esses achados indicam que os linfócitos respondem ao HIIE com aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Porém, até o momento, nenhum estudo avaliou o impacto do HIIE no desequilíbrio redox associado a função de linfócitos.

Embora o HIIE ofereça uma alternativa de exercício de baixo volume, as sessões são de alta intensidade, apesar da curta duração, e podem, potencialmente implicar em um quadro agudo de desequilíbrio redox, e consequente redução na função imunológica. Assim, este trabalho investigou o efeito de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade na função e desequilíbrio redox em células mononucleares do sangue periférico em homens jovens não treinados.

3.0 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade na função e equilíbrio redox de linfócitos em indivíduos não treinados.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar o efeito do HIIE na função de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) considerando:

- a contagem total e diferencial de leucócitos;
- a resposta proliferativa de linfócitos;
- a produção de citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ ;
- a viabilidade celular.

3.2.2 Avaliar o efeito agudo do HIIE no estado redox de PBMC considerando:

- a concentração de TBARS;
- a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) de linfócitos.

3.2.3 Avaliar o efeito do HIIE na ativação dos linfócitos considerando:

- a frequência de expressão de CD25 e CD69 nas subpopulações CD4, CD8 e CD19.

4.0 Material e métodos

A realização desse estudo obedeceu aos princípios éticos para pesquisa envolvendo seres humanos, recebendo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e está registrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE 10239112.8.0000.5108.

4.1 Voluntários

Foram selecionados para participar do estudo 16 homens com idade entre 18 e 35 anos, eutróficos, não fumantes, não treinados ou fisicamente ativos, com $VO_{2max} \geq 30$ e ≤ 50 mL/kg/min, e que não estavam engajados em atividade física recreacional ou esportiva, com frequência mínima de 3 vezes por semana, nos 3 meses anteriores ao início do estudo. Para participar do estudo os voluntários deveriam ainda relatar não apresentar qualquer distúrbio musculoesquelético, doença autoimune, cardíaca, pulmonar ou de hipersensibilidade. Os voluntários selecionados não estavam fazendo uso de medicamentos anti-inflamatórios ou suplementos alimentares, incluindo substâncias com função antioxidante, durante o período do estudo, e não haviam sido imunizados por pelo menos uma semana antes da participação no estudo. Os participantes do estudo não apresentaram risco para realização de atividade física, de acordo com os questionários de Prontidão para Atividade Física (PAR-Q) (*Canada's physical activity guide to healthy active living*, 2007) (ANEXO 2) e de Risco Coronariano (ACSM, 2009) (ANEXO 3). Para avaliação do risco coronariano os valores de colesterol total e glicemia de jejum dos voluntários foram determinados por exames laboratoriais.

4.2 Delineamento do estudo

O estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira delas foi avaliado o efeito agudo do HIIIE na função e no estado redox de linfócitos e participaram desta etapa do estudo 10

voluntários. Na segunda etapa, foi avaliado o efeito agudo do HIIE na indução da expressão de marcadores de ativação nas subpopulações de linfócitos e na viabilidade celular, o que envolveu a participação de 6 voluntários (figura 2).

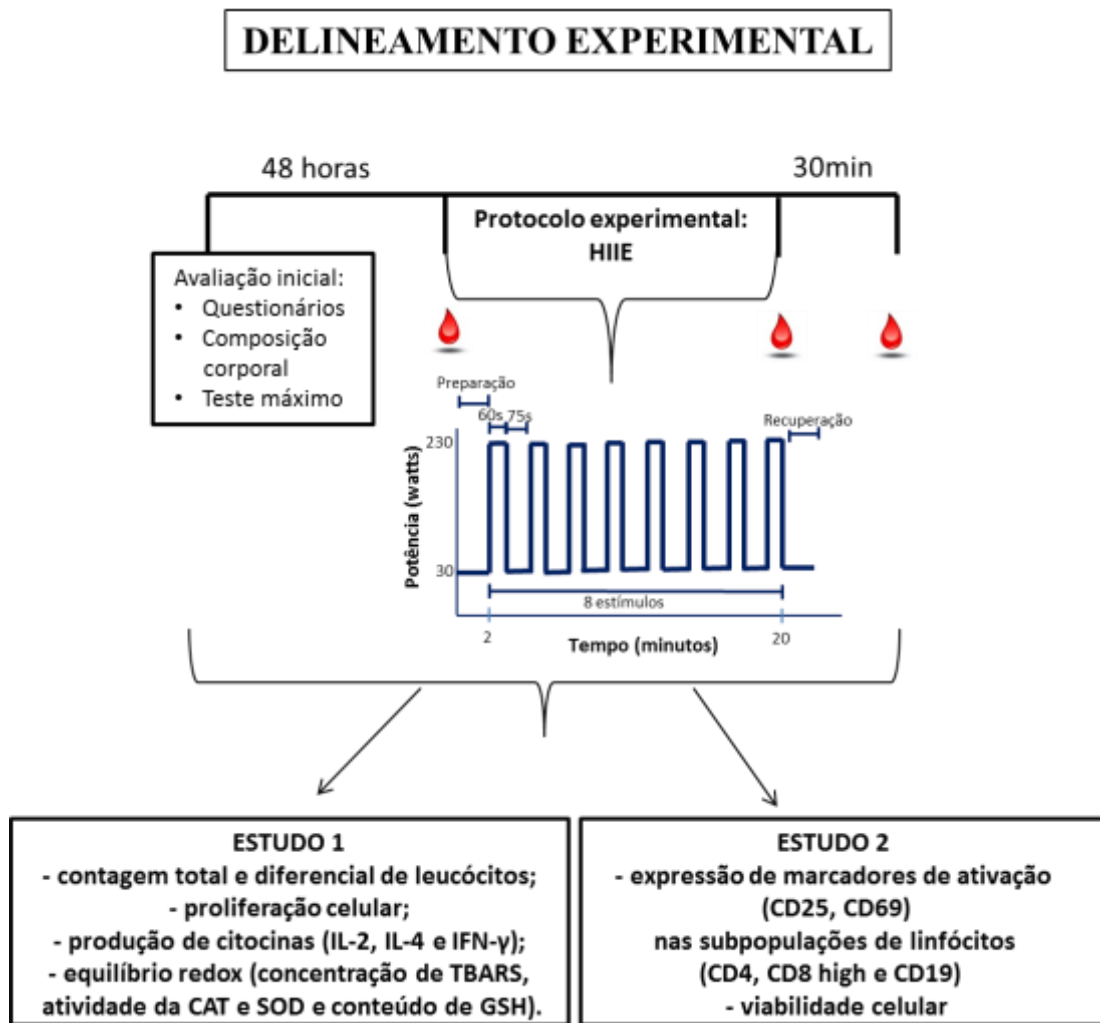


FIGURA 2. Delineamento experimental do estudo. Dezesesseis voluntários ($n = 10$, estudo 1; $n = 6$, estudo 2) realizaram uma sessão de HIIE, composta por 8 estímulos de 60 segundos a 100 ou 90% da potência máxima intercalados de 75 segundos de recuperação ativa a 30W de potência. Amostras de sangue foram coletadas antes, imediatamente após e 30 minutos após a realização do HIIE. Pelo menos 48 horas antes do HIIE os voluntários passaram por medidas pré-teste que incluíram (aplicação de questionários, avaliação da composição corporal e teste máximo). IL-2 – interleucina 2, IL-4 – interleucina 4, IFN- γ – interferon gama, TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, CAT – catalase, SOD – superóxido dismutase, GSH – glutatona reduzida.

Em ambas as etapas, antes das sessões de exercício, os voluntários foram instruídos a abster-se de atividade física extenuante e do consumo de bebidas alcoólicas por 24 horas, do

consumo de cafeína e do uso de corticosteroide tópico ou aspirina por 48 horas e do uso de anti-histamínicos ou de corticoide sistêmico por 1 semana. Os participantes também foram questionados se obtiveram no mínimo 8 horas de sono antes das sessões de exercício. Na manhã dos testes, os voluntários foram orientados a ingerir 500 mL de água duas horas antes dos testes (ACSM, 2007), e consumir, 30 minutos antes do exercício, uma dieta rica em carboidratos, que teve como base a recomendação da *American Diabetes Association* (ADA, 2000), que preconiza a ingestão de 200 a 300g de carboidratos no pré-exercício, tratando-se de exercícios vigorosos.

4.2.1 Avaliação inicial

Na primeira visita ao laboratório, a massa, estatura e composição corporal dos voluntários foram determinadas. A massa e a estatura corporal foram medidas em balança analógica com estadiômetro acoplado (Welmy, modelo 110, Brasil). A partir da massa e estatura corporal foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) por divisão da massa corporal (kg) pelo quadrado da estatura (m²) (Organização Mundial de Saúde, 2000).

4.2.1.1 Avaliação da composição corporal

No estudo 1, para a avaliação da composição corporal foi utilizada a mensuração das dobras cutâneas em três regiões (abdômen, coxa e peito) com o adipômetro (Sanny, AD1010-1, Brasil) e calculado o percentual de gordura, utilizando da equação de Jackson e Pollock (1978).

No estudo 2 foi utilizada a absorciometria radiológica de dupla energia (DXA, DPX, Lunar Radiation Corporation, Madison, Wisconsin, USA) para avaliação da composição corporal. Para essa análise, os voluntários foram posicionados na área de escaneamento do equipamento, de modo que a linha sagital demarcada nessa área passasse sob o centro de alguns pontos anatômicos como crânio, coluna vertebral, pélvis e pernas. Os sujeitos foram

avaliados trajando roupas leves, sem o uso de qualquer objeto de metal que pudesse interferir nas medidas.

4.2.1.2 Avaliação da capacidade aeróbica e potência máximas

No estudo 1, para determinação da capacidade aeróbica máxima (VO_2 máximo) e potência máxima os indivíduos foram submetidos a um teste de esforço máximo, utilizando o protocolo proposto por Balke (BALADY *et al.*, 2003), em cicloergômetro (Ideal, MMX, Brasil).

O protocolo de Balke foi iniciado com carga de 25 W (proposto para sedentários) e manteve-se durante todo o teste velocidade constante de 60 rpm. A cada dois minutos, aumentou-se a carga em 25 W, sucessivamente, até o esforço máximo ou a presença de algum sintoma limitante. Durante o teste, os voluntários receberam estímulos verbais padronizados dos avaliadores para que permanecessem em atividade até o limite máximo percebido. Todos os testes foram finalizados a pedido dos voluntários (fadiga voluntária). No momento da fadiga, a carga foi retirada e os voluntários continuaram a pedalar por 2 minutos a 25 W.

A frequência cardíaca (FC) foi registrada a cada 1 minuto, durante todo o teste, usando um monitor de frequência cardíaca Polar® RS800cx (Polar Electo Oy, Kempele, Finlândia). A escala de Borg (1982) também foi utilizada, a cada minuto do teste, para determinar a percepção subjetiva do esforço (PSE).

O teste foi considerado máximo quando os seguintes critérios foram observados: FC máxima > 95% da máxima prevista para a idade e percepção subjetiva do esforço entre 18 e 20 (YOON *et al.*, 2007).

Utilizou-se a equação 1 (BALKE e WARE, 1959), para calcular de forma indireta o consumo máximo de oxigênio dos voluntários:

$$\text{VO}_2 = 200 + [12 \times \text{potência (W)}] / \text{massa (kg)} \quad (\text{equação 1})$$

A potência máxima do voluntário foi considerada a potência desenvolvida no último estágio completo do protocolo.

No estudo 2, o VO_2 max e potência máxima foram determinados em teste de esforço máximo, utilizando o protocolo de rampa, em cicloergômetro (Ideal, MMX, Brasil), de acordo com Whipp *et al.*, (1981).

Para a condução do protocolo de rampa, primeiramente foi estimada a potência máxima dos voluntários pelo *Veterans Specific Activity Questionnaire* (VSAQ) (ANEXO 4). O VSAQ apresenta uma lista de atividades com aumento progressivo de intensidade em termos de equivalentes metabólicos (METs). Os voluntários foram instruídos a determinar no questionário a primeira atividade que poderia causar fadiga ou falta de ar que levaria à interrupção do exercício após 5 a 10 minutos. A partir dos METs, conforme equação 2, derivados do VSAQ, e levando-se em conta a idade dos voluntários, foi utilizado um nomograma (MYERS *et al.*, 1994) para determinar a capacidade máxima de trabalho individual dos voluntários:

$$\text{METs} = 4,7 + 0,97 (\text{VSAQ}) - 0,06 (\text{idade}) \quad (\text{equação 2})$$

Posteriormente, foi predita a capacidade máxima para o exercício a partir da equação 3: (MYERS,1996)

$$\text{Capacidade de trabalho (W): } (\text{METs} - 1) \times \text{massa corporal (kg)} / 3,486$$

(equação 3)

O protocolo de rampa consistiu inicialmente de dois minutos de preparação a 50 rpm e 25 W de potência. Em seguida, a partir dos dados obtidos da capacidade de trabalho, os

incrementos de carga ocorreram a cada 60 s, de tal forma que a fadiga ocorresse entre o oitavo e décimo segundo minutos de teste. Durante o teste, os voluntários receberam estímulos verbais padronizados dos avaliadores para que permanecessem em atividade até o limite máximo percebido. Todos os testes foram finalizados a pedido dos voluntários (fadiga voluntária). No momento da fadiga, a carga foi retirada e os voluntários continuaram a pedalar por 2 minutos a 25 W.

Utilizou-se a equação 4 (ACSM, 2009) para calcular de forma indireta o consumo máximo de oxigênio dos voluntários:

$$\text{VO}_2 = 10,8 \times [\text{taxa de trabalho}(\text{kg/m})] / \text{massa corporal (kg)} + 7 \quad (\text{equação 4})$$

Além disso, determinou-se a potência máxima atingida no teste, como a potência desenvolvida no último estágio completo do protocolo.

Em ambos os estudos, os testes foram realizados em câmara ambiental, com temperatura seca de 22°C e umidade relativa do ar de 60%. Antes do teste os voluntários permaneceram em repouso por 20 minutos, na posição sentada, dentro da câmara ambiental. Em seguida foi aferida a pressão arterial e os voluntários foram conduzidos ao cicloergômetro.

4.3 Exercício experimental

Após os procedimentos anteriormente descritos, decorrido um intervalo mínimo de 48 horas, os voluntários realizaram uma sessão aguda de HIIE.

Anteriormente ao teste os voluntários receberam as orientações anteriormente descritas (item 4.2). Ao se apresentarem para a sessão aguda, os voluntários foram questionados sobre o cumprimento das orientações. O exercício foi realizado em câmara ambiental, com temperatura seca de 22°C e umidade relativa do ar de 60%.

No estudo 1, após 10 minutos de repouso na posição sentada, os voluntários realizaram uma sessão de HIIE, em bicicleta ergométrica (Moviment, BM 2800 PRO, Brasil), que foi composta por 8 estímulos a 100% da potência máxima, intercalados por 75 segundos de recuperação ativa a 30 W. Um estímulo adicional inicial serviu de teste para determinar a carga a ser utilizada nos estímulos seguintes. No início e ao final da sessão de HIIE os voluntários pedalarão por 2 minutos, a 30 W, como atividade preparatória e para recuperação ativa, respectivamente.

No estudo 2, após os 10 minutos de repouso sentado, os voluntários realizaram uma sessão de HIIE, em cicloergômetro (Excalibur Sport, Lode, USA), que foi composta por 8 estímulos a 90% da potência máxima, intercalados por 75 segundos de recuperação ativa a 30 W. No início e ao final da sessão de HIIE os voluntários também pedalarão por 2 minutos, a 30 W, como atividade preparatória e para recuperação ativa, respectivamente.

Durante o exercício experimental foram mensuradas a frequência cardíaca, durante todo o exercício, utilizando um monitor cardíaco (Polar Electro Oy, Kempele, Finlândia), e a percepção subjetiva de esforço, pela escala de Borg (1982), a cada minuto.

Antes (pré-ex), imediatamente após (pós-ex) e 30 minutos após o exercício (30 min-pós) amostras de sangue (aproximadamente 20mL) foram coletadas, da veia antecubital, em tubos a vácuo contendo heparina (Vacutainer; Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) para posterior análise da função de PBMC a saber:

Estudo 1: proliferação e a secreção de citocinas em resposta à estimulação superantigênica; e estado redox;

Estudo 2: viabilidade celular; percentual de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD19⁺; e percentual de linfócitos CD4, CD8 e CD19 positivos para CD25 e CD69 em resposta a estimulação superantigênica.

4.4 Processamento das amostras

4.4.1 Contagem global e diferencial dos leucócitos

As amostras sanguíneas foram cuidadosamente homogeneizadas e, na sequência, diluídas utilizando o diluidor automático de células (DA-500, Celm, Brasil). Para a contagem global de leucócitos (CC – 550, Celm, Brasil), foram adicionadas às amostras 2 gotas de solução hemolisante (Cellmlise II, Celm, Brasil). Foram também determinadas nas amostras a concentração de hemoglobina e hematócrito. Estas variáveis foram utilizados para correção da contagem total dos leucócitos, em função da variação do volume plasmático após o exercício, de acordo com Dill e Costill (1974).

Para a contagem diferencial de leucócitos foi realizada a técnica do esfregaço sanguíneo. Uma gota de sangue foi colocada sobre uma lâmina de vidro que na sequência foi distendida. Para coloração do esfregaço foram utilizados os corantes hematológicos May-Grunwald (azul de metileno 1%) e Giemsa (1,5%), previamente confeccionados (VALLADA, 1999). Vinte gotas de May Grunwald foram adicionadas sobre a lâmina. Após 4 minutos a mesma quantidade de água destilada foi adicionada e após 1 minuto a solução sobrenadante foi desprezada. As lâminas foram na sequência cobertas por 20 gotas do corante Giemsa por 20 minutos. Finalmente as lâminas foram lavadas em água corrente suave e secas ao ar livre.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se o microscópio (Cover-018, Olympus Optical do Brasil, Brasil) e o contador manual de células (CCS-01, Splabor, Brasil). A microscopia das células do esfregaço sanguíneo foi iniciada em objetiva de menor aumento (10x) focalizando-se a região em que os eritrócitos começam a ficar soltos, e por fim em objetiva de imersão (100x). Finalmente realizou-se a contagem diferencial em contador manual, no qual foram contadas 100 células e definido o percentual de linfócitos, monócitos e granulócitos. A leitura do esfregaço sanguíneo foi realizada de maneira uniforme, de modo a percorrer as bordas e o centro da lâmina, sempre em direção à cauda do esfregaço.

O número absoluto de cada tipo de leucócito foi obtido por meio da multiplicação do valor percentual obtido na contagem diferencial pela contagem total de leucócitos.

4.4.2 Obtenção das PBMC

Para obtenção das PBMC o sangue foi diluído na proporção 1:1 em tampão fosfato salina (PBS 0,015M; pH 7,2/7,4) e centrifugado (400 xg, 21°C, 30 min) em Histopaque® 1077 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), conforme descrito por Bicalho *et al*, (1981). O anel de PBMC, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado 2 vezes em PBS (250 xg, 4°C, 15 min). Em seguida, as células foram suspensas em 1 mL de PBS suplementado com 0,1% de soro albumina bovina (PBS/BSA 0,1%) e, após contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer, a concentração foi ajustada para de 1×10^7 células/mL. A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de exclusão de azul de tripan e mostrou-se sempre superior a 98%.

4.4.3 Estudo 1 - Avaliação da proliferação celular

Para essa análise foi utilizada a técnica de incorporação e decaimento da fluorescência de CFSE (5-[and 6]-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), conforme descrito por Lyons *et al* (2000). Para isso, 5×10^6 células, suspensas em PBS/BSA 0,1%, foram incubadas a 37°C por 10 minutos em 1000µL de CFSE (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10µM). A reação foi interrompida adicionando-se 10mL de RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) gelado, suplementado com L-glutamina (2mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), soro fetal bovino (10%) (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) e coquetel antibiótico/antimicótico (penicilina G 100 UI/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 ng/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), o que denominamos de RPMI completo, seguido de incubação em gelo por 5 minutos. Após duas lavagens com RPMI (220 xg, 4°C, 10 min), as células foram suspensas em 500µL de RPMI completo (1×10^6 células/mL).

Cerca de 5×10^5 células coradas com o CFSE foram incubadas, em placas de 24 poços, na ausência ou presença do superantígeno B de *Staphylococcus aureus* (SEB, 100ng/mL) (Sigma, USA), em volume final de 2000 μ L, com RPMI completo. As culturas permaneceram por 5 dias em estufa úmida, a 37°C contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação, as células foram recolhidas e lavadas, por 2 vezes com PBS gelado (200 μ L, 4°C, 10 min), e a proliferação celular foi determinada pela medida do decaimento da fluorescência do CFSE, através da citometria de fluxo, utilizando o FACScan® (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), equipado com um laser de argônio (488 nm) e os seguintes filtros: 530/30 nm BP (FL1 = fluorescência verde) e 586/42 BP (FL2 = fluorescência laranja) e 650 LP (FL3 = fluorescência vermelha). Foram adquiridos 50.000 eventos na região correspondente as células de interesse.

A estratégia de análise, utilizando o programa *CellQuest* (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), consistiu, inicialmente, na seleção da população linfocitária pela análise de gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC – *forward-scattered light*) em função da granulosidade (SSC – *side-scattered light*) celulares, para culturas não estimuladas (região R1, figura 3A) e estimuladas com SEB (região R2, figura 3B). Os eventos em R1 e R2 foram analisados para a intensidade de fluorescência do CFSE, usando histogramas de FL1 em função do número de eventos (figura 3C e D). A região M1 foi definida como células marcadas com CFSE derivadas de culturas não estimuladas, que representa o pico de células quiescentes (figura 3C). Os picos M2 a M7 foram definidos de acordo com a intensidades de CFSE em culturas estimuladas com SEB (figura 3D).

O índice de proliferação (IP) foi calculado a partir da frequência das células nas regiões M1 a M7, considerando que duas células com uma determinada intensidade CFSE foram produzidas por mitose de uma única célula, possuindo uma intensidade de CFSE imediatamente maior. Para o cálculo do IP foram utilizadas as equações 5 e 6, onde X0

representa a percentagem de células que não se dividiram (localizadas em M1), e X1 a X7 representam a percentagem de células que passaram por uma ou mais divisões sequenciais (células localizadas de M2 a M7) (ÂNGULO e FULCHER, 1998).

$$IP = \frac{100-Y}{Y} \quad (\text{equação 5})$$

$$\text{onde, } Y (\%) = X0 + \frac{X1}{2} + \frac{X2}{4} + \frac{X3}{8} + \frac{X4}{16} + \frac{X5}{32} + \frac{X6}{64} + \frac{X7}{128} \quad (\text{equação 6})$$

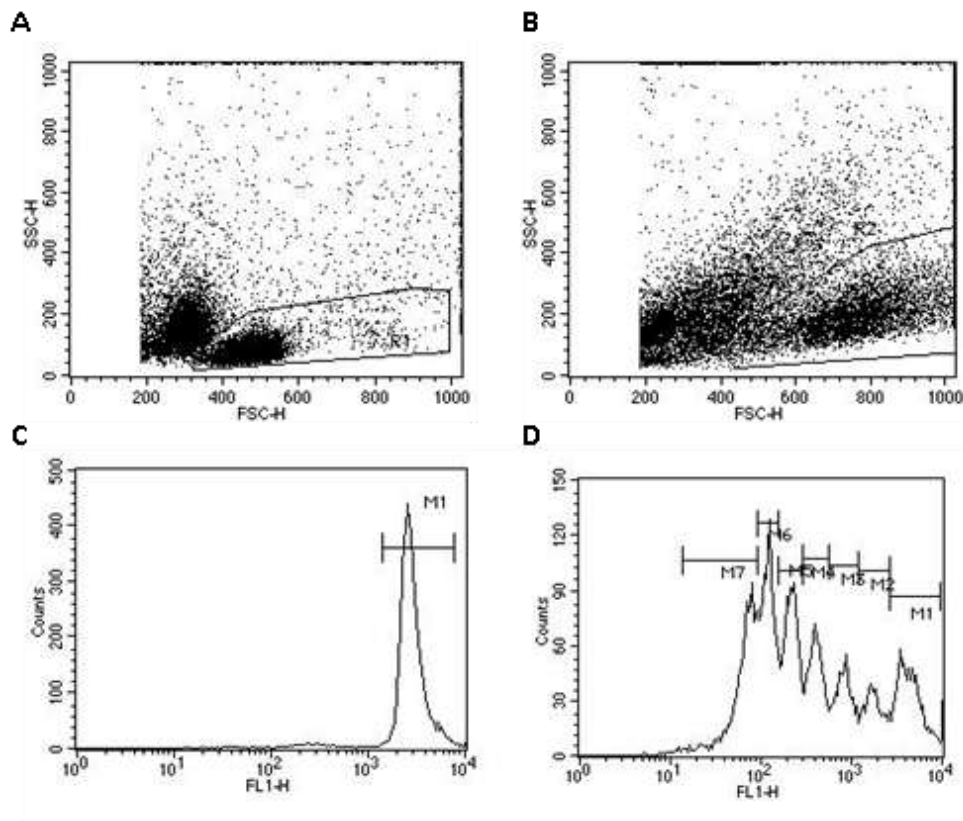


FIGURA 3. Estratégia de análise da proliferação celular pelo decaimento da fluorescência do CFSE. Gráficos de distribuição pontual FSC x SSC (A e B) são utilizados para a seleção das populações desejadas nas culturas não estimuladas (A) e estimuladas com SEB (B). Histogramas de FL1 x número de eventos (C e D), foram utilizados para definir as regiões M1 a M7, nas culturas não estimuladas (C) e estimuladas com SEB (D), a partir da quais foi obtido o índice de proliferação (IP) para a população de linfócitos.

4.4.4 Estudo 1 - Análise da secreção de IL-2, IL-4 e IFN- γ

As PBMC foram isoladas como descrito no item 4.4.2. Em seguida, 5×10^5 células foram incubadas em RPMI completo, estimuladas ou não com SEB (100ng/mL) (Sigma, USA), em placas de 24 poços, com o volume de cultura ajustado para 1000 μ L, com RPMI completo. As culturas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por 18 horas. Após esse período de incubação, o sobrenadante das culturas foi recolhido e centrifugado (200 xg, 10 minutos, 20° C) para a determinação da concentração de IL-2, IL-4 e IFN- γ por ELISA (DuoSet, R&D Systems, EUA). Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com orientação do fabricante, conforme descrito a seguir.

Para a sensibilização da placa de 96 poços de fundo chato, adicionou-se 100 μ L/poço do anticorpo de captura (4 μ g/mL - anticorpo de camundongo anti-IL-2 humano, anti-IL-4 humano, ou anti-IFN- γ humano), e incubou-se a placa à temperatura ambiente por 18 horas. Em seguida a placa foi lavada cinco vezes com 300 μ L/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2-7,4), utilizando lavadora de microplacas (ELx50, Biotek, USA). A solução remanescente foi retirada secando-se a placa em papel toalha. O bloqueio dos sítios reativos da placa foi realizado pela adição de 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% de albumina bovina e 0,05% de azida sódica) seguida de 1 hora de incubação à temperatura ambiente. Por fim, a placa foi lavada como descrito anteriormente e a solução remanescente foi totalmente removida secando-se a placa em papel toalha.

Para a quantificação de IL-2, IL-4 e IFN- γ nas amostras, foram adicionados 100 μ L/poço do sobrenadante das culturas, em duplicata. Para a curva padrão foram adicionados 100 μ L/poço do padrão de IL-2, IL-4 ou IFN- γ (IL-2 humana recombinante, 60 ng/mL, IL-4 humana recombinante, 50 ng/mL ou IFN- γ humana recombinante 55 ng/mL) diluídos em PBS nas concentrações de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 pg/mL. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e, ao final desse período, foi lavada com solução tampão

de lavagem, como já descrito, seguido de completa remoção da solução remanescente em papel toalha. Na sequência, foram acrescentados 100 µL/poço de anticorpo de detecção (anticorpo de cabra anti-IL-2 humano biotilado em estoque a 90 µg/mL, anti-IL-4 humano biotilado em estoque a 2,25 µg/mL ou anti-IFN- γ humano biotilado 90 µg/mL) diluído em reagente diluente (Tris 20mM contendo 0,1% de albumina bovina e 0,05% de Tween 20) a 0,5 µg/mL. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada com solução tampão de lavagem, seguida da adição de 100 µL/poço de estreptavidina conjugada com *horseradish-peroxidase* (Estreptavidina-HRP) diluída 1:200 em reagente diluente. Ao final de 20 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, a placa foi lavada e adicionou-se 100 µL/poço do substrato TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina, Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluído em tampão citrato (Na₂HPO₄ 0,4 mM e citrato de sódio 0,2 mM, pH 5) contendo 0,005% de peróxido de hidrogênio. A placa foi incubada no escuro, à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida foram acrescentados 50 µL/poço da solução de parada H₂SO₄ 2N.

A determinação da densidade óptica foi realizada nos comprimentos de onda de 450 e 570 nm em leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Para a determinação da concentração das citocinas avaliadas em cada cultura, as densidades ópticas em 450 nm foram subtraídas daquelas correspondentes em 570 nm para efeito de correção de imperfeições ópticas da placa. Após obtidos os resultados das absorbâncias foi calculado a concentração de citocinas presente nas amostras através de análise de regressão linear, utilizando para isso os valores da curva padrão e o *software* GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4.4.5 Estudo 1 - Análise do estado redox das PBMC

Para avaliar o equilíbrio redox das PBMC foi determinada a concentração de TBARS, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase CAT e o conteúdo de GSH nas amostras coletadas antes, imediatamente após e 30 minutos após HIIE.

As PBMC (1×10^7 células/mL), suspensas em PBS, foram congeladas e descongeladas 3 vezes para promover a lise celular. O lisado celular foi centrifugado ($10.000 \times g$, 15 min) e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade das enzimas SOD e CAT e concentração de TBARS.

4.4.5.1 – Determinação da concentração de TBARS

A reação do ácido tiobarbitúrico com o MDA, principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS, de acordo com o método descrito por descrito por Ohkawa e colaboradores (1979). Alíquotas de lisado celular (0,2 mL) foram adicionadas em 250 μ L de ácido acético (2,5M, pH 3,4) e 250 μ L ácido tiobarbitúrico (0,8%). Esta mistura foi incubada por 90 minutos a 95° C e depois centrifugada a 5.000 $\times g$ por 5 minutos (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific, EUA). O sobrenadante da reação foi análise, em duplicata, no leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) à 532nm. A concentração de TBARS foi estimada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de malondialdeído (1,1,3,3-tetramethoxypropane) (Sigma, EUA) como padrão externo. A quantidade de malondialdeído (MDA) produzido foi interpretada como a concentração de TBARS. Os resultados foram expressos em equivalentes de MDA/ 10^7 células.

4.4.5.2 – Determinação da atividade da SOD

O ensaio para determinar a atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi realizado de acordo com Srivastava (2007) com algumas modificações. Resumidamente, foi adicionado 1mL de tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,8) contendo 1mM de ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) a 0,1 mL do lisado celular. As amostras e tampão foram

aquecidos a 37° C durante 3 minutos. A reação foi iniciada com a adição do pirogalol (0,2mM) (Sigma, EUA). A leitura foi realizada durante 4 minutos à 37°C no leitor de microplacas (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a 420 nm, em duplicata. A atividade da enzima, expressa em U/10⁷ células, foi determinada a partir da capacidade da superóxido dismutase em inibir a autoxidação do pirogalol, onde 1U = 50% de inibição da autoxidação do pirogalol.

4.4.5.3 – Determinação da atividade da CAT

O ensaio da CAT (EC 1.11.1.6) foi realizado conforme o método de Nelson e Kiesov (1972), com algumas modificações. Resumidamente, o peróxido de hidrogênio (0,3M) foi adicionado como substrato da reação a 0,03 mL de lisado celular, em tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,0), resultando em uma concentração final de H₂O₂ de 2mM. A leitura foi realizada durante 1 minuto à 25°C em espectrofotômetro a 240nm (Libra S22 spectrophotometer, Biochrom, UK), em duplicata. Este procedimento evita a possível interferência associada com a atividade da glutathione peroxidase, uma vez que os cofatores necessários não estão presentes no meio da reação. A atividade da catalase foi expressa em milimoles de H₂O₂ decomposto por minuto/10⁷ células.

4.4.5.4 – Determinação do conteúdo de GSH

O conteúdo de GSH foi determinado em PBMC íntegras, usando o corante *Thiol Tracker Violet*® (Molecular Probes, USA) por citometria de fluxo, de acordo com Mandavilli e Janes (2010). O *Thiol Tracker* reage ativamente com tióis reduzidos em células intactas e pode ser lido eficientemente com laser de 405 nm ou de xenônio ou lâmpadas de mercúrio tradicionais de uso em análise celular por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. A glutathione reduzida representa a maioria dos tióis livres intracelulares em células, portanto, o *Thiol Tracker* pode ser usado para estimar o conteúdo celular de glutathione reduzida.

Para esta análise, 1×10^6 PBMC foram incubadas com *Thiol Tracker* ($2 \mu\text{M}$), em PBS, durante 30 min a 37°C . As células foram então centrifugadas ($200 \times g$, 10 min) e suspensas em 0,2 mL de PBS, e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

O citômetro utilizado foi o FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com 3 lasers (violeta 405 nm, vermelho 633 nm, azul 488 nm), dois triângulos (510/50 BP e 450/50 BP, triângulo 1; 780/60 BP e 660/20 BP triângulo 2) e um octógono (488/10 BP, 530/30 BP, 585/42 BP, 670 LP, 780/60 BP). Foram adquiridos 30.000 eventos, na região correspondente aos linfócitos.

Os dados foram analisados utilizando-se o *software* FACS Diva v.6.1.3. A estratégia de análise consistiu, inicialmente, na seleção da população linfocitária pela análise de gráficos de distribuição pontual FSC *versus* SSC (figura 4A e C). Em seguida, utilizando histogramas de intensidade de fluorescência em função do número de células, foi determinada a intensidade de fluorescência (mediana da fluorescência) para as células marcadas com *Thiol Tracker* (figura 4D). Células não marcadas foram utilizadas como controle (figura 4B).

4.4.6 Estudo 2 - Análise da morte celular por apoptose

O ensaio foi realizado utilizando o quíte para detecção de apoptose FITC-Anexina V (BD Pharmigen, USA). Para isso, PBMC foram obtidas como anteriormente descrito (item 4.4.2). O procedimento de marcação foi realizado seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente 2×10^5 células ($20 \mu\text{L}$) foram incubadas com $1 \mu\text{L}$ de anti-anexina-FITC, $1 \mu\text{L}$ de iodeto de propídeo (PI) e $8 \mu\text{L}$ da solução diluída do *binding buffer* que acompanha o quíte, por 15 minutos, ao abrigo da luz. Posteriormente adicionou-se $80 \mu\text{L}$ de *binding buffer* e as células foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II. Foram adquiridos 20.000 eventos na região correspondente aos linfócitos.

Para análise dos dados foi utilizado o *software* FACSdiva v6.1.3. Inicialmente os linfócitos foram selecionados gráficos de distribuição pontual FSC *versus* SSC. Em seguida,

em gráficos de distribuição pontual, anexina V-FITC x iodeto de propídeo foram determinadas as porcentagens de células não marcadas (viáveis), marcadas somente pela anexina-V (apoptose recente) ou PI (necrose) e duplo-marcadas (apoptose tardia).

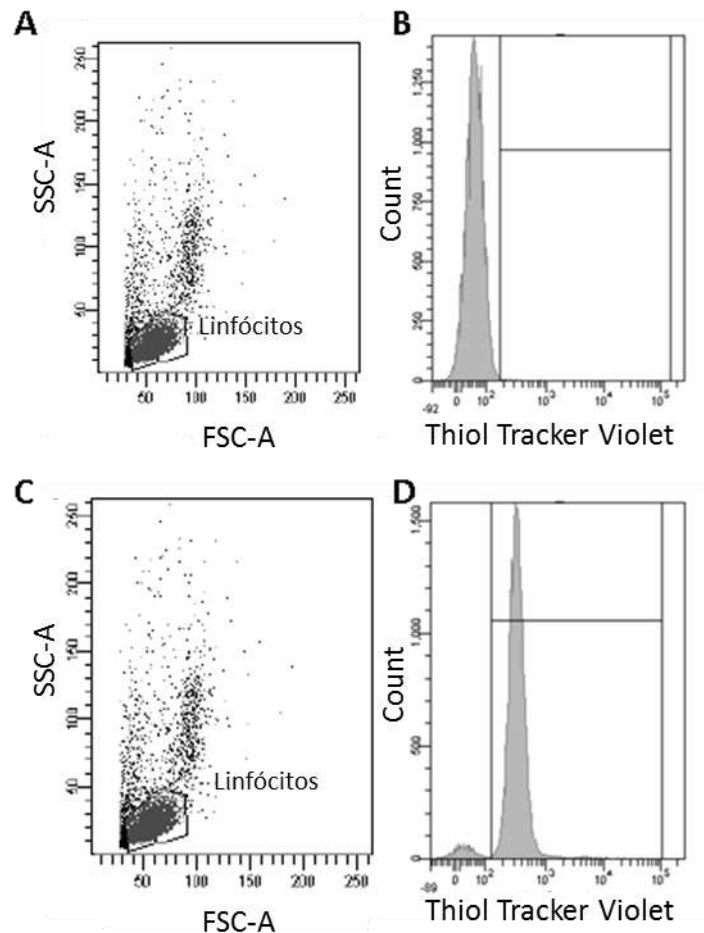


FIGURA 4. Estratégia de análise do conteúdo de GSH por citometria de fluxo. Gráficos de distribuição pontual FSC x SSC (A e C) foram utilizados para a seleção das populações desejadas. B – histograma de intensidade de fluorescência das células não marcadas (Controle). D – histograma de intensidade de fluorescência das células após marcação com Thiol Tracker Violet. FSC – *forward-scattered light* e SSC – *side-scattered light*.

4.4.7 Estudo 2 - Análise da ativação de linfócitos

PBMC ($2,5 \times 10^6$ células) foram estimuladas ou não com SEB (100ng/mL), em RPMI completo, em placas de 24 poços, com volume ajustado para 1500 μ L, por 18 horas, em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida as células foram recolhidas, lavadas em PBS gelado (200 μ g, 4°C, 10 min) e suspensas em 250 μ L de PBS. As células foram então transferidas para

placas de 96 poços de fundo redondo (2×10^5 células/poço) (20 μ L) e incubadas, por 15 minutos a 4° C, com uma das seguintes misturas de anticorpos monoclonais: 1) CD4 PE + CD8 PECy5 + CD69 FITC; 2) CD4 PE + CD8PECy5 + CD25 FITC, 3) CD19 PE + CD69FITC e 4) Controle de isotipo – rato anti-camundongo IgG1 FITC + IgG2a+b PE + IgG2a+b PerCP. As informações sobre os anticorpos utilizados no estudo estão apresentadas na tabela 1. Na sequência foram adicionados aos poços 150 μ L de PBS, para a lavagem das células (220 xg, 4°C, 10 min). O sobrenadante foi descartado e as células suspensas e fixadas em 200 μ L de paraformaldeído 2%, para posterior análise por citometria de fluxo. Trinta mil eventos na região dos linfócitos foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II.

Para análise dos dados utilizou-se o software FACS Diva v.6.1.3. Inicialmente, foi selecionada a população de linfócitos, em gráficos de distribuição pontual FSC *versus* SSC (figura 5A). Em seguida, em gráficos de distribuição pontual para as combinações de fluorocromos utilizados, foram quantificadas as frequências de células CD4⁺CD69⁺, CD4⁺CD25⁺, CD8^{high}CD69⁺, CD8^{high}CD25⁺, CD19⁺ CD69⁺ (figuras 5B, C e D), para células estimuladas ou não por SEB.

Foi calculado também o percentual de células que expressavam o marcador de ativação (CD69⁺ ou CD25⁺) por uma determinada subpopulação de linfócito (CD4⁺, CD8^{high} ou CD19⁺), considerando a frequência total de determinada subpopulação linfocitária.

4.5 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa *Statistica* (v10.0, StatSoft, Inc, EUA). Foram considerados estatisticamente significativo valores de $p \leq 0,05$. Os dados estão apresentados como a média \pm EP (erro padrão). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para

TABELA 1. Anticorpos monoclonais, conjugados com fluorocromos, utilizados para análise de subpopulações linfocitárias e marcadores de ativação celular.

Anticorpos monoclonais	Fluorocromo	Marca	Clone
camundongo anti-CD4 humano	PE	BD Pharmingen	RPA-T4
camundongo anti-CD8 humano	PE Cy5	BD Pharmingen	MOPC-21
camundongo anti-CD19 humano	PE	BD Pharmingen	HIB19
camundongo anti-CD25 humano	FITC	BD Pharmingen	M-A251
camundongo anti-CD69 humano	FITC	BD Pharmingen	FN50
rato anti-IgG1 camundongo	FITC	BD Pharmingen	A85-1
rato anti- IgG2 _{a+b} camundongo	PE	BD Pharmingen	X57
rato anti- IgG2 _{a+b} camundongo	PerCP	BD Pharmingen	X57

PE = Ficoeritrina

PE-Cy5 = Ficoeritrina-Cianina

FITC = Isotiocianato de Fluoresceína

PerCP = Proteína Clorofila Peridinina IgG = imunoglobulina G

avaliar a normalidade dos dados. Uma vez que as variáveis dependentes apresentaram distribuição normal foram utilizados testes paramétricos para a análise estatística. A análise de variância (ANOVA) *one-way* com medidas repetidas foi utilizada para avaliar o efeito do HIIIE nos parâmetros de estado redox (TBARS, GSH, CAT e SOD) e na morte celular por apoptose. A ANOVA *two way* com medidas repetidas foi usada para avaliar o efeito HIIIE sobre a proliferação celular, produção de citocinas e a expressão de marcadores de ativação

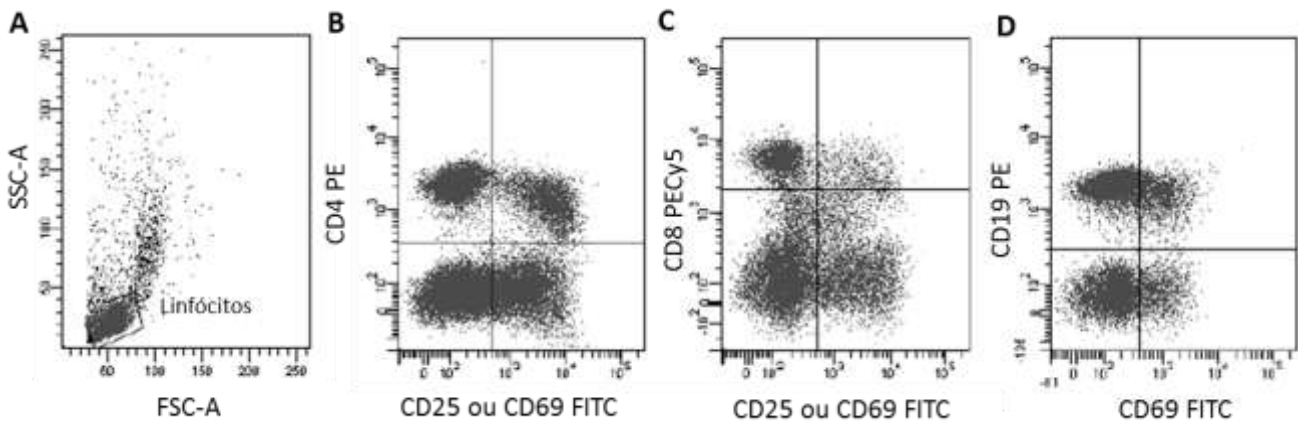


FIGURA 5. Estratégia de análise para os marcadores de ativação de linfócitos. A - gráfico de distribuição pontual FSC x SSC foram utilizados para a seleção dos linfócitos. A análise do percentual de células $CD4^+CD69^+$ e $CD4^+CD25^+$ (B), $CD8^{high}CD69^+$ e $CD8^{high}CD25^+$ (C) e $CD19^+CD69^+$ (D) foram realizadas em gráficos de distribuição pontual para os fluorocromos utilizados. Todos os gráficos ilustram a frequência de células oriundas de culturas estimuladas com SEB.

induzidas pelo SEB entre os momentos (pre-ex, pos-ex, 30 min pos-ex). A significância da diferença entre as médias obtidas foi determinada pelo *post hoc* de Tukey. Para comparação de parâmetros da amostra e do HIIE entre os dois estudos foi utilizado o Teste t de *Student*. Os gráficos apresentados foram confeccionados no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5.0 Resultados

Este estudo foi dividido em duas etapas experimentais. Na primeira etapa, que avaliou o efeito agudo de uma sessão de HIIE sobre a resposta proliferativa e de secreção de citocinas ao estímulo por superantígeno, e equilíbrio redox de PBMC, participaram do estudo 10 voluntários. Na segunda etapa, que avaliou o efeito agudo do HIIE na expressão de marcadores de ativação nas subpopulações de linfócitos, participaram 6 voluntários. Os dados referentes às características físicas e fisiológicas dos voluntários dos dois estudos estão apresentados na tabela 2. Não observamos diferença estatística ($p > 0,05$) na comparação da idade, IMC e $VO_{2\text{ pico}}$ dos voluntários dos dois estudos. Os dados também demonstram que, de acordo com os critérios de inclusão, os voluntários que participaram dos dois estudos, eram jovens, não treinados e eutróficos.

TABELA 2. Características físicas e fisiológicas dos voluntários.

Características	Estudo 1	Estudo 2
Idade (anos)	23,7 ± 1,1	21,3 ± 1,8
IMC (kg/m ²)	21,3 ± 0,8	21,9 ± 0,7
VO ₂ pico (mLO ₂ /kg/min)	33,6 ± 1,2	36,6 ± 1,8
Potência máxima (W)	172,3 ± 7,0	233,8 ± 19,2*

Dados apresentados em média ± EP. IMC = índice de massa corporal. Estudo 1, n = 10. Estudo 2, n = 6. Somente a potência máxima apresentou diferença estatística entre os estudos, as demais variáveis não apresentaram diferenças significativas entre os estudos 1 e 2. Teste t de *Student*. * $p \leq 0,05$.

Os dados de frequência cardíaca média e percepção subjetiva do esforço média, durante o estímulo e os intervalos de recuperação do HIIE, dos dois estudos, estão apresentados na tabela 3.

TABELA 3. Parâmetros fisiológicos dos voluntários durante o HIIE.

Parâmetro	Estudo 1	Estudo 2
FC média do estímulo do HIIE (bpm)	144,0 ± 6,1	157,0 ± 5,1
FC média da recuperação do HIIE (bpm)	117,0 ± 5,2	120,0 ± 4,5
PSE média do estímulo do HIIE	13,0 ± 0,6	13,0 ± 0,9
PSE da recuperação do HIIE	11,0 ± 0,6	10,0 ± 0,4

Dados apresentados em média ± EP. FC = frequência cardíaca, PSE = percepção subjetiva de esforço, bpm = batimentos por minuto, HIIE = exercício intervalado de alta intensidade. Estudo 1, n = 10. Estudo 2, n = 6. Não foram observadas diferenças significativas, considerando os parâmetros apresentados, entre os estudos 1 e 2. Teste t de *Student*.

Os dados da frequência cardíaca média e percepção subjetiva do esforço média, durante os estímulos e intervalos de recuperação do HIIE, indicam a diferença entre o período de estímulo e repouso, mostrando o aumento da FC e PSE durante o estímulo e diminuição na recuperação ativa, o que confirma o modelo de exercício proposto (intervalado de alta intensidade). Demonstrou ainda que não houve diferença entre os dois estudos, mostrando assim que a intensidade do estímulo provocou as mesmas alterações em FC e PSE.

Na sequência serão descritos primeiramente os resultados do estudo 1 (contagem global e diferencial de leucócitos, índice de proliferação celular, concentração de IL-2 e IFN- γ no sobrenadante da cultura de PBMC e estado redox das PBMC), e em seguida os resultados do estudo 2 (viabilidade celular, frequência da expressão dos marcadores de ativação de linfócitos CD25 e CD69 e frequência das subpopulações linfocitárias).

5.1 Estudo 1 - Efeito do HIIE sobre a função de linfócitos e estado redox das PBMC

Observamos aumento significativo ($p < 0,001$) dos leucócitos totais imediatamente após o HIIE. Porém, 30 minutos após o exercício o número de leucócitos retornou aos valores pré-exercício, caracterizando assim uma leucocitose temporária induzida pelo HIIE. Na contagem diferencial observamos diferença estatística somente em neutrófilos segmentados ($p = 0,02$) (tabela 4).

TABELA 4. Efeito do HIIE sobre a contagem global e diferencial de leucócitos.

Células/mm ³	Pré-ex	Pós-ex	30 min pós	P
Leucócitos totais	5883,0 ± 357,0	6978,0 ± 323,6*	6141,0 ± 270,3**	< 0,001
Monócitos	351,9 ± 59,6	516,5 ± 60,2	391,1 ± 95,0	0,34
Linfócitos	2483,0 ± 286,6	2741,0 ± 191,6	2248,0 ± 276,8	0,13
Neutrófilos segmentados	2793,0 ± 212,5	3460,0 ± 249,1*	3227,0 ± 278,2	0,02
Neutrófilos bastonetes	89,6 ± 27,6	59,1 ± 23,7	109,5 ± 39,7	0,47
Basófilos	21,8 ± 21,8	39,4 ± 39,4	31,7 ± 22,5	0,58
Eosinófilos	100,3 ± 63,9	161,5 ± 64,4	68,9 ± 36,5	0,47

Dados apresentados em média ± EP. Pré-ex = pré-exercício, pós-ex = imediatamente após exercício, 30min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *one-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 10. * diferença estatística entre pré-ex e pós-ex, ** diferença estatística entre pós-ex e 30 min pós.

Na figura 6 estão representados os dados do efeito de uma sessão de HIIE sobre a proliferação de linfócitos em resposta ao estímulo por SEB. A análise inicial mostrou interação entre o exercício e o estímulo superantigênico ($p = 0,01$). A resposta proliferativa das PBMC ao SEB imediatamente após e 30 minutos após a sessão de HIIE foi menor, comparado ao pré-ex ($p = 0,02$).

A redução da proliferação induzida por SEB pode ser resultado da redução do percentual de células que entraram no ciclo celular. Assim, avaliamos também o percentual de células em M1, ou seja percentual de células que não se dividiram após 5 dias de estimulação com o SEB. Nós observamos que o percentual de células em M1 foi aproximadamente 35%

maior imediatamente após o exercício ($16,1 \pm 13,3\%$) em comparação com pré-exercício ($12,0 \pm 8,2\%$) ($p = 0,05$, Anova *one-way* com medidas repetidas, *post hoc* de Tukey).

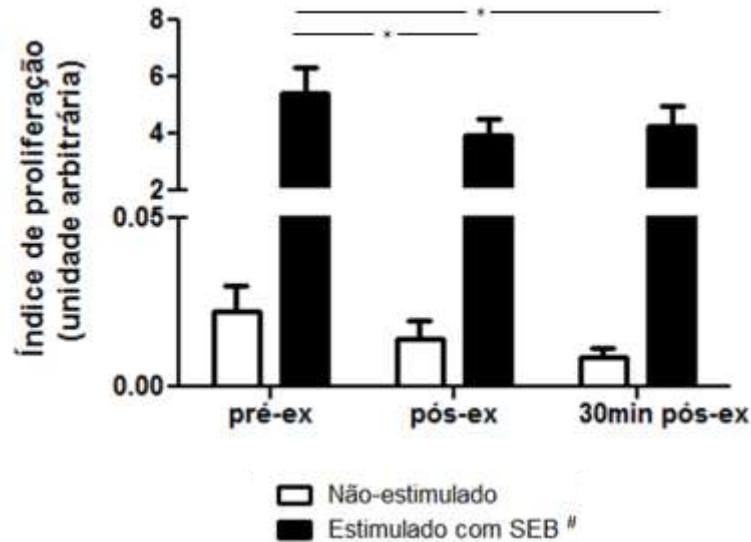


FIGURA 6. Efeito do HIE sobre a proliferação de linfócitos induzida por SEB. Dados apresentados como média \pm EP. # $p < 0,05$, em comparação com células não estimuladas, em todos os momentos. * $p < 0,05$, entre os momentos. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *two-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 10.

Como a resposta proliferativa, vimos também que o exercício modulou a secreção de citocinas pelas PBMC, induzida por SEB. Interação entre o exercício e o estímulo superantigênico ($p = 0,03$) foi também observado para a produção de IL-2. Os dados da figura 7A mostram aumento ($p = 0,006$) da concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura 30 minutos após o exercício, quando comparado com o pré-exercício. Não foi observado efeito do exercício sobre a secreção de IFN- γ (figura 7B) ($p = 0,37$). A produção de IL-4 não foi detectada no sobrenadante da cultura (dado não mostrado).

O efeito do exercício sobre o estado redox das PBMC é mostrado na figura 8. Foi observado aumento da concentração de TBARS ($p = 0,02$), 30 minutos após o exercício, quando comparado com o pré-ex (figura 8A), enquanto que nenhum efeito do exercício foi observado no conteúdo de GSH das PBMC (figura 8B). Já a atividade da CAT nas PMBC foi

reduzida ($p = 0,04$) 30 min após o exercício (figura 8C), quando comparada ao pré-ex. Nenhum efeito do HIIE foi observado para a atividade da SOD (figura 8D). Esses resultados demonstram alteração do equilíbrio redox 30 minutos após HIIE, caracterizado por elevação na concentração de TBARS e redução na atividade da CAT.

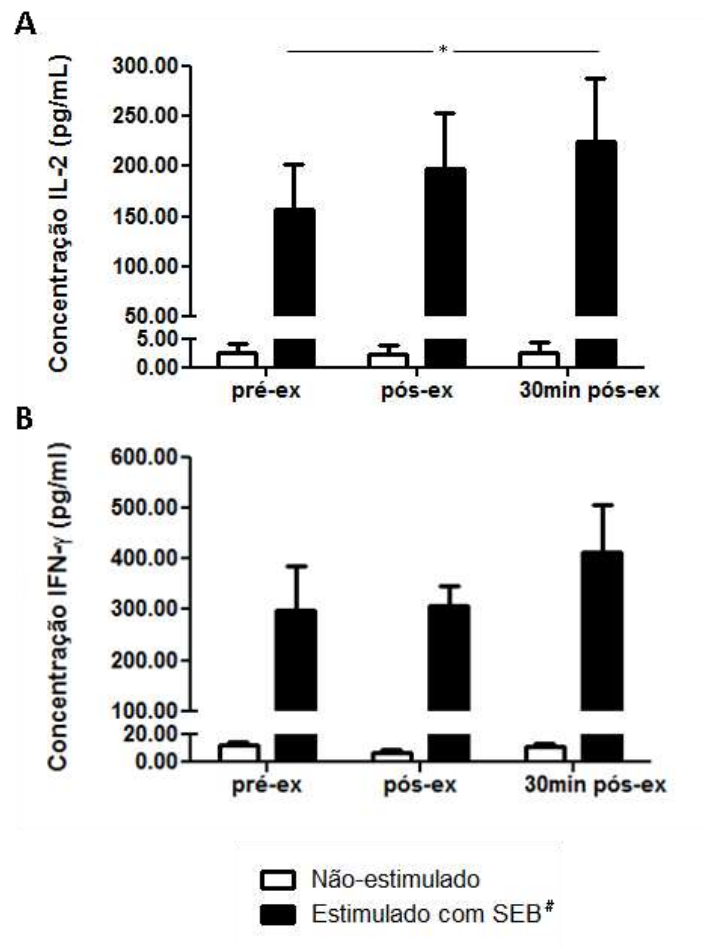


FIGURA 7. Efeito do HIIE sobre a secreção de citocinas por PBMC em resposta à estimulação com SEB. (A) Concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura. (B) Concentração de IFN- γ no sobrenadante da cultura. Dados apresentados como média \pm EP. # $p < 0,05$, em comparação com células não estimuladas, em todos os momentos. * $p < 0,05$, entre os momentos. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *two-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 10.

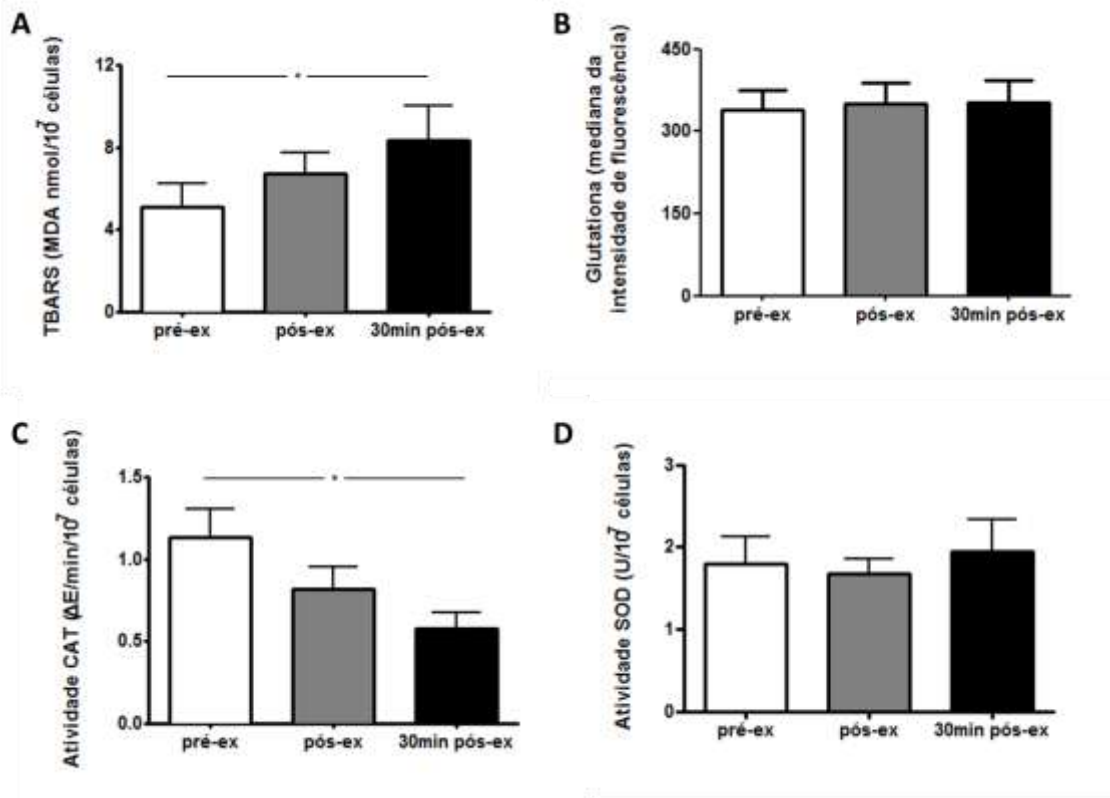


FIGURA 8. Efeito do HIIE no estado redox das PBMC. A = concentração de TBARS; B = conteúdo de GSH. C = atividade da CAT; D = atividade da SOD. Dados apresentados como média \pm EP. * $p < 0,05$, em comparação com pré-ex. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *one-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 10.

5.2 Estudo 2 – Efeito do HIIE sobre a expressão de marcadores de ativação celular

Como observamos redução da resposta proliferativa de PBMC, associada com o aumento da concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura de células estimuladas por SEB, foi realizado um segundo estudo para avaliar o efeito do HIIE na expressão de marcadores de ativação celular induzida por SEB em subpopulações de linfócitos e a viabilidade dos linfócitos.

Como pode ser observado na tabela 5, não houve diferença significativa na frequência de células viáveis, apoptóticas ou necróticas imediatamente após e 30 minutos após o

exercício, comparado com o pré-exercício. Estes resultados mostram que o HIIE não altera a viabilidade de PMBC.

Em relação a expressão dos marcadores de ativação celular, a análise inicial mostrou interação entre o exercício e o estímulo superantigênico ($p \leq 0,001$). Observamos que a frequência de células $CD4^+CD25^+$ (figura 9A) ($p \leq 0,001$) e $CD4^+CD69^+$ (figura 9B) ($p \leq 0,001$; poder = 0,98 e tamanho do efeito = 0,53) foi menor imediatamente após o exercício, sugerindo menor ativação de células T pelo estímulo superantígeno após o HIIE.

TABELA 5. Efeito do HIIE sobre a viabilidade das PBMC.

	pré-ex	pós-ex	30 min pós-ex	p
Células viáveis (%)	76,9 ± 8,8	76,6 ± 9,9	75,6 ± 10,3	0,9
Apoptose recente (%)	22,3 ± 8,5	22,8 ± 9,7	23,5 ± 9,6	0,7
Apoptose tardia (%)	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,3
Necrose (%)	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0*	0,2 ± 0,1**	0,05

Dados apresentados em média ± EP. Pré-ex = pré-exercício, pós-ex = imediatamente após exercício, 30min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *one-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 10. * diferença estatística entre pré-ex e pós-ex, ** diferença estatística entre pós-ex e 30 min pós.

No entanto a frequência de células $CD4^+$ foi modificada pelo exercício. Imediatamente após o exercício a frequência de células $CD4^+$ foi 40% menor ($p = 0,006$, Anova *one-way* com medidas repetidas, *post hoc* de Tukey) em relação ao pré-ex ($33,5 \pm 20,6\%$ e $20,0 \pm 11,0\%$ – pré e pós-exercício, respectivamente), embora tenha retornado a valores basais 30 minutos após o exercício ($27,3 \pm 12,2\%$). Assim, quando a frequência de células $CD4^+CD25^+$ (figura 9C) e $CD4^+CD69^+$ (figura 9D) foi normalizada pela frequência total de células $CD4^+$, não foi observado efeito do exercício, indicando que redução da frequência de células ativadas foi consequência da redução do número de células.

Uma resposta semelhante foi observada para a ativação de células B ($CD19^+$) (figura 10). A frequência de células $CD19^+CD69^+$ foi menor imediatamente após o exercício, em comparação com pré-ex ($p \leq 0,01$) (figura 10A). No entanto também foi observada redução ($p = 0,02$, Anova *one-way* com medidas repetidas, *post hoc* de Tukey) do total de linfócitos $CD19^+$ ($10,2 \pm 5,1\%$, $5,4 \pm 1,9\%$, pré e pós-exercício, respectivamente), que também retornou aos valores pre-exercício 30 minutos após o exercício ($10,9 \pm 3,7\%$). Neste contexto, não houve efeito do exercício sobre a ativação das células B quando a frequência de $CD19^+CD69^+$ foi normalizada pelo número total de células $CD19^+$ (figura 10B).

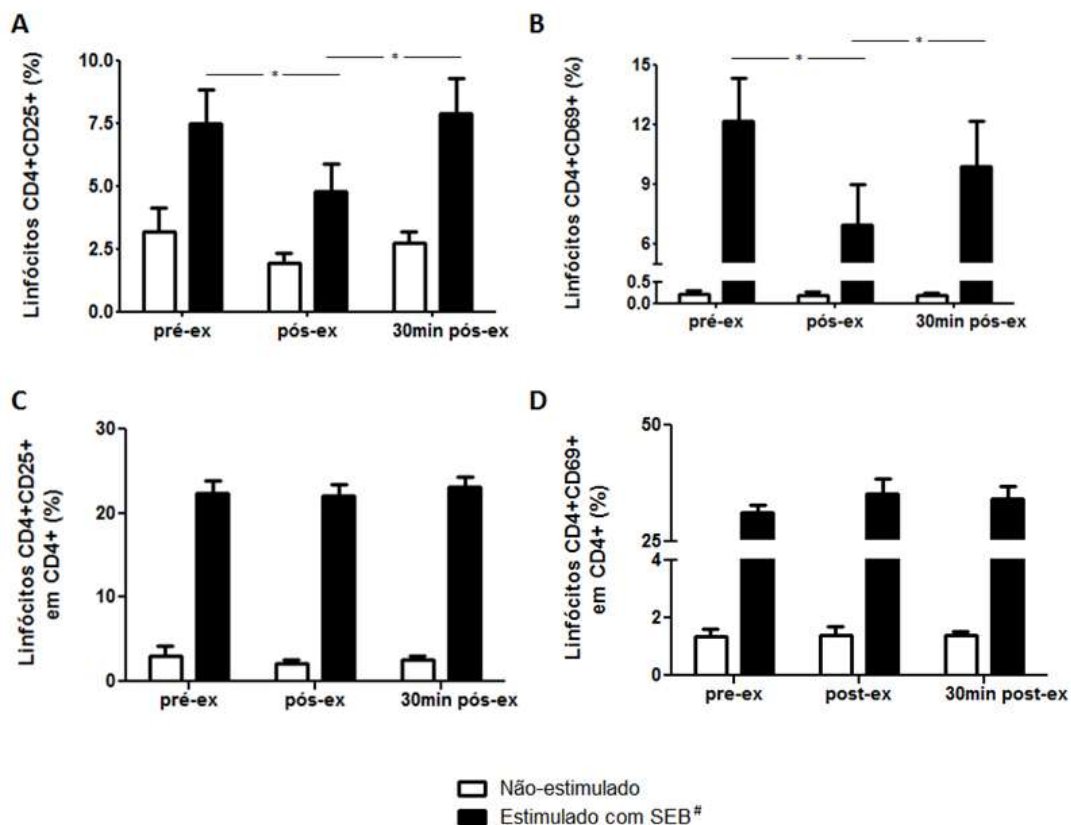


FIGURA 9. Efeito do HIIE sobre a ativação das células T auxiliares por SEB. A = Frequência de linfócitos $CD4^+CD25^+$. B = Frequência de linfócitos $CD4^+CD69^+$. C = Frequência de células $CD4^+CD25^+$ na subpopulação de células T auxiliares ($CD4^+$). D = Frequência de células $CD4^+CD69^+$ na subpopulação de células T auxiliares ($CD4^+$). Dados apresentados como média \pm EP. # $p < 0,05$, em comparação com células não estimuladas, em todos os momentos. * $p < 0,05$, entre os momentos. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o

exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *two-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 6.

Não foi observado efeito do exercício ($p = 0,36$) na frequência de células T citotóxicas ($CD8^{\text{high}}$) (pré-ex: $19,2 \pm 7,1\%$, pós-ex: $16,9 \pm 6,3\%$ e 30 min pós-ex: $17,5 \pm 5,0\%$) e, desta forma, nenhum efeito do exercício sobre a frequência de marcadores de ativação, induzida pelo SEB, CD25 (figura 11A) e CD69 (figura 11B) foi observada.

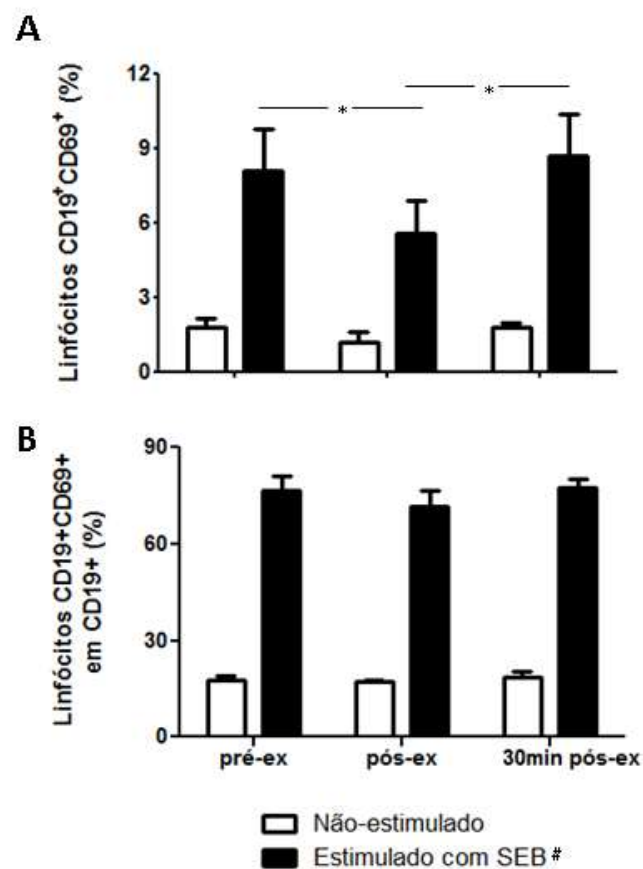


FIGURA 10. Efeito do HIEE sobre a ativação de células B por SEB. A = Frequência de linfócitos $CD19^+CD69^+$. B = Frequência de células $CD19^+CD69^+$ na subpopulação de células B ($CD19^+$). Dados apresentados como média \pm EP. # $p < 0,05$, em comparação com células não estimuladas, em todos os momentos. * $p < 0,05$, entre os momentos. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *two-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 6.

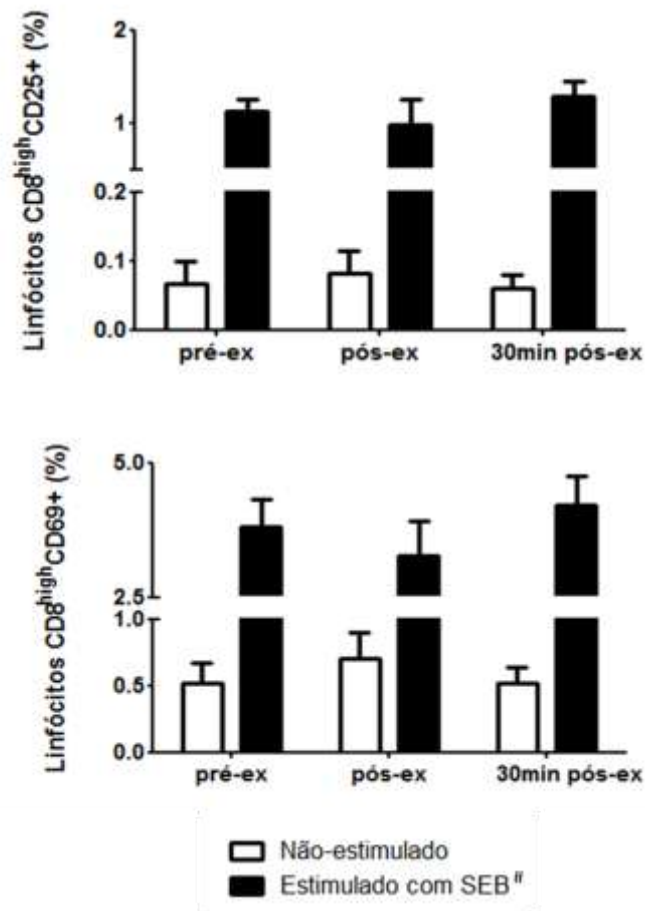


FIGURA 11. Efeito do HIE sobre a ativação de células T citotóxicas pelo SEB. A - Frequência de linfócitos CD8^{high}CD25+. B - Frequência de linfócitos CD8^{high}CD69+. Dados apresentados como média ± EP. #p <0,05, em comparação com células não estimuladas, em todos os momentos. Pré-ex = antes do exercício, pós-ex = imediatamente após o exercício, 30 min pós-ex = 30 min após o exercício. Anova *two-way* com medidas repetidas; *post-hoc* de Tukey. N = 6.

6.0 Discussão

Este trabalho mostra, pela primeira vez, o efeito de uma sessão HIIE sobre a função e estado redox de células mononucleares do sangue periférico. Nossos resultados mostram que após o HIIE a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico em resposta a estimulação com superantígeno SEB foi reduzida, apesar do aumento da concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura. O HIIE também induziu desequilíbrio redox em células mononucleares, marcado pelo aumento da concentração de TBARS e redução da atividade da catalase.

Como os linfócitos T são essenciais para a resposta imune adaptativa, estes têm sido o foco de vários estudos que investigam a relação entre a função imunológica, exercício e saúde do atleta (THARP e PREUSS, 1991). Visto anteriormente que a proliferação de linfócitos é uma etapa crucial na resposta imune adaptativa na erradicação de infecções, uma forma de avaliar a função dos linfócitos T é determinar o índice de proliferação nestas células.

Devido a sua característica de baixo volume, o exercício intervalado ganhou destaque como modalidade de treinamento para indivíduos não atletas nos últimos anos (BURGOMASTER *et al*, 2005, 2006, LITTLE *et al*, 2010). No entanto, tem sido proposto que o exercício de alta intensidade possa diminuir a função imunológica (MOREIRA *et al*, 2009). Como mostrado, a resposta proliferativa de linfócitos à estimulação com SEB foi reduzida após o HIIE. A proliferação de linfócitos ao estímulo antigênico é um evento inicial na indução da imunidade adquirida, e que reflete o grau de ativação das populações linfocitárias, sendo um importante episódio junto a complexa rede de estímulos inflamatórios imune-mediados (BOYMAN *et al*, 2007). Neste contexto, a redução observada sugere um efeito imunossupressor da sessão de HIIE.

Apesar de nenhum outro estudo ter investigado a resposta proliferativa de linfócitos após o HIIE, tem sido observada diminuição da resposta proliferativa de linfócitos em

resposta ao estímulo com mitógenos, após o exercício contínuo de longa duração (NIEMAN *et al*, 1994; VIDER *et al*, 2001). Nieman *et al*, (1994) avaliaram o efeito de duas sessões de exercício contínuo, uma de intensidade moderada (45min, 50% do VO₂max) e outra de alta intensidade (45 min, 80% VO₂max), na resposta proliferativa de linfócitos de indivíduos jovens e bem condicionados estimulados, *in vitro*, por ConA. A resposta proliferativa dos linfócitos ao estímulo por ConA foi menor 1 e 2 horas após o exercício contínuo. De maneira similar Vider *et al.*, (2001) observaram diminuição da resposta mitogênica de linfócitos ao estímulo por ConA e PHA em indivíduos jovens treinados que realizaram exercício em esteira até a exaustão.

Já Tvede *et al* (1994) demonstraram que a resposta proliferativa de células CD4⁺ não alterou durante o exercício, mas a contribuição da subpopulação de células CD4⁺ na proliferação declina, devido a uma diminuição da proporção de células CD4⁺. Green, Rowbottom e Mackinnon (2003) relataram redução na resposta proliferativa de linfócitos ao estímulo por PHA, em indivíduos jovens treinados, após 60 minutos de corrida em esteira, a 95% do limiar anaeróbico. Porém, foi observado redução significativa no percentual das células T CD3⁺, e, portanto, quando avaliou-se a proliferação celular considerando apenas as células CD3⁺, não houve efeito do exercício na proliferação, demonstrando que a diminuição da proliferação seria decorrente da redução do número de linfócitos T em circulação após o exercício. Embora, em nosso estudo, não tenhamos realizado esta análise, não podemos descartar que a redução observada na proliferação celular seja decorrente de alteração na distribuição das subpopulações de linfócitos, como será discutido mais a frente.

Uma diferença deste estudo para os citados anteriormente, é a utilização de estímulos diferentes. O que vale ressaltar nesse estudo é a estimulação dos linfócitos com o superantígeno SEB, que reproduz, de uma forma mais próxima, a ativação antigênica de linfócitos. Isso ocorre porque os superantígenos são apresentados às células T ligados às

regiões invariantes da molécula de MHC de classe II das células apresentadoras de antígeno (FLEISCHER *et al*, 1989; DELLABONNA *et al*, 1990; LANDO *et al*, 1993).

Em contraste com a redução da resposta proliferativa, a concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura foi maior após o HIIE. Apenas um estudo avaliou o efeito HIIE sobre a produção de citocinas. Zwetsloot *et al* (2014) avaliaram o efeito agudo do HIIE na concentração plasmática de citocinas, em indivíduos jovens, ativos recreacionalmente ($VO_2\text{max} = 49,2 \pm 2,6 \text{ mL O}_2/\text{kg}/\text{min}$), utilizando um protocolo de exercício muito semelhante ao deste estudo (8 estímulos de 60 s a 100% do $VO_2\text{max}$ ($314 \pm 45\text{W}$), intercalados de 75 s a 50W totalizando 20 minutos de exercício. Foi observado aumento nas concentrações de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, entretanto não foi observado nenhuma alteração em IFN- γ , IL-1 β e fator de estimulação de macrófagos e granulócitos (GMCSF). Entretanto esse estudo avaliou a concentração sistêmica das citocinas, ou seja, no soro sanguíneo o que não nos permite comparação visto que avaliamos a produção de citocinas em cultura de PBMC.

IBFELT *et al* (2002) avaliaram a produção de IFN- γ , IL-4 e IL-2 por células T CD4⁺ e CD8⁺ após estímulo com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina, em indivíduos jovens antes, imediatamente após e duas horas após um exercício contínuo de longa duração (1,5 horas a 75% do $VO_2\text{max}$). Não houve diferença na expressão de IFN- γ após o exercício, mas 2 horas após o exercício a expressão de IFN- γ produzidas pelas células T CD8⁺ foi reduzida. Já a expressão de IL-2 e IL-4 nas subpopulações CD4 e CD8 não foram alteradas pelo exercício.

Além das dificuldades inerentes à comparação com estudos que avaliam protocolos de exercício contínuos, vale salientar também a diferenças nos métodos de quantificação de citocinas. Neste estudo as citocinas foram quantificadas no sobrenadante de culturas, estimuladas por 18 horas, por ELISA. Uma limitação em relação a esta abordagem é a impossibilidade de se conhecer a fonte produtora da citocina, além da possibilidade de

consumo da citocina pelas células na cultura, o que dificulta a comparação dos nossos resultados com a literatura.

A menor resposta proliferativa associada a maior concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura parece contraditório, uma vez que esta citocina é o principal fator indutor da proliferação de linfócitos (ZHANG, 2006). No entanto, como já mencionado, a medida da concentração de IL-2 no sobrenadante da cultura pode não refletir exatamente o quanto desta citocina foi produzido, considerando o seu consumo pelas células em cultura. Neste contexto, a maior concentração de IL-2 pode refletir o consumo reduzido desta citocina pelas células, o que levaria à redução da proliferação celular observada. Isso sugere que a expressão de CD25, a cadeia α do receptor da IL-2, poderia estar diminuída após o HIIE.

Em paralelo com a reduzida resposta proliferativa dos linfócitos e o aumento na concentração de IL-2 no sobrenadante de cultura, nossos dados mostram também um desequilíbrio redox celular depois da sessão de HIIE, indicado por aumento da concentração de TBARS e reduzida atividade de catalase nas PBMC. Embora haja uma visão geral de que, de acordo com a intensidade, uma sessão aguda de exercício pode promover desequilíbrio redox em células e tecidos, incluindo as células do sistema imune, os estudos com linfócitos e com HIIE são escassos. Apenas um estudo avaliou o efeito do HIIE em parâmetros de equilíbrio redox em linfócitos (FISHER *et al*, 2011). Indivíduos recreacionalmente ativos foram submetidos a uma sessão de HIIE baseada no teste de *Wingate*, onde o indivíduo realizou 4 ciclos compostos de 30 segundos a 90% da potência máxima intercalados com 4 minutos de recuperação a 15% da potência máxima. Foi coletado sangue periférico para análise de marcadores de estresse oxidativo antes, imediatamente após, 3 e 24 horas após. Os resultados indicaram, diferente dos achados deste estudo, que linfócitos respondem a uma sessão aguda de HIIE com aumento na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e glutathiona peroxidase, acompanhado por aumento da peroxidação lipídica no plasma.

Tauler *et al* (2004) avaliaram o efeito de um teste máximo (exercício de alta intensidade e curta duração), realizado em cicloergômetro, nas defesas antioxidantes de linfócitos. Atletas amadores jovens foram submetidos a um teste, inicialmente a 50W de potência, com aumento de 30W a cada 3 minutos, até que o indivíduo atingisse o VO_2 máx. Eles observaram diminuição da atividade de CAT e GPX nos linfócitos dos indivíduos após o teste, semelhante, em parte, ao que observamos em resposta a uma sessão aguda de HIIE.

Visto que o HIIE causou um desequilíbrio redox nas PBMC, podemos associar esse evento à diminuição na função dos linfócitos, medida pela proliferação de linfócitos. A literatura mostra que o estresse oxidativo pode induzir a apoptose de linfócitos, provavelmente assim reduzindo sua função (WANG e HUANG, 2005). Assim, a proliferação de linfócitos prejudicada, possivelmente, devido ao desequilíbrio redox poderia estar associada a morte celular ou reduzida ativação celular. Neste contexto, o segundo estudo que compõe esta dissertação avaliou o efeito de uma sessão de HIIE sobre a morte e ativação celular.

Não observamos, após o HIIE, aumento da morte por apoptose recente, tardia ou necrose, o que sugere que a diminuição da proliferação celular não seria decorrente da redução na viabilidade de linfócitos. Como não houve indução de morte, outra explicação para os resultados do estudo 1 seria a menor ativação de linfócitos em decorrência do HIIE. Inicialmente, nossos resultados indicaram menor ativação dos linfócitos T auxiliares e B por SEB, após o HIIE, já que a frequência de células $CD4^+$ e $CD19^+$ positivas para CD25 e CD69 foi menor imediatamente após o exercício.

Ainda não existem relatos sobre o efeito do HIIE na ativação antigênica/superantigênica de linfócitos. Contudo, semelhante a este estudo, Vider *et al* (2001) relataram redução da frequência de células T $CD4^+$ expressando CD69, induzida por mitógeno, em indivíduos jovens treinados imediatamente após um teste incremental na esteira

até a exaustão. Em contraste, Ronsen *et al* (2001) não observaram efeito do exercício contínuo (65 min a 70% VO₂max) sobre a expressão de CD69 em células T CD4⁺ e CD8⁺. E de maneira similar, Green, Rowbottom e Mackinnon (2003) também não observaram alteração na frequência de células T expressando CD69, induzida por mitógeno, em indivíduos jovens treinados, após 60 minutos de corrida em esteira, a 95% do limiar anaeróbico.

A menor ativação dos linfócitos observada poderia, então, explicar a reduzida proliferação e maior concentração de IL-2 observadas no primeiro estudo. No entanto a frequência de células CD4⁺ e CD19⁺ foi, temporariamente, reduzida pelo exercício. Assim, quando a frequência de células CD25⁺ e CD69⁺ foram normalizadas pela frequência total de células CD4⁺ e CD19⁺, não foi observado efeito do exercício, indicando que não houve efeito do HIIE na ativação de linfócitos por SEB.

Vários estudos demonstraram uma concordância qualitativa entre a ativação e a proliferação de linfócitos, em que a expressão de CD69 é um determinante eficaz das respostas funcionais dos linfócitos T a uma variedade de estímulos (CARUSO *et al*, 1997; MAINO, 1995; MARDINEY, BROWN e FLEISHER, 1996; TESTI, PHILLIPS e LANIER, 1989a; 1989b). Porém, embora seja essencial que os linfócitos T sejam ativados antes de proliferarem, nem todas as células ativadas continuam até completar a divisão celular. As células ativadas podem seguir várias outras vias alternativas essenciais, incluindo a produção de citocinas, a citotoxicidade, a apoptose, ou morte induzida por ativação (BUDD, 2001), o que poderia explicar a menor proliferação observada após o exercício, apesar deste não ter afetado a ativação celular.

Outra possível explicação para a alteração da função celular observada após o HIIE pode estar na própria técnica utilizada para a quantificação da proliferação. Geralmente, nos ensaios de proliferação, um número constante de células (PBMC) é usada para avaliar a

proliferação, como foi realizado neste estudo. No entanto, o exercício faz com que ocorra tanto aumento no número de linfócitos em circulação quanto uma alteração no percentual relativo dos subconjuntos de linfócitos. Isso inclui aumento no número de células NK e células T, com aumento maior de NK em relação a células T (FRISINA *et al*, 1994), aumentando a proporção de células NK em relação aos linfócitos T. As células NK não proliferam em resposta à estimulação com superantígeno. Conseqüentemente, em ensaios utilizando um número fixo de PBMC, que consiste de uma mistura de vários subtipos celulares, existem células capazes de responder menos à estimulação com superantígeno. Assim, a alteração da composição relativa de linfócitos é o um fator que pode contribuir para a redução da resposta proliferativa observada após o exercício (HINTON e ROWBOTTOM, 1997).

Neste contexto Green, Rowbottom e Mackinnon (2002) utilizaram de uma técnica com microesferas magnéticas para a remoção das células NK em PBMC. Neste modelo foi avaliada a proliferação celular ao estímulo por PHA em 12 corredores treinados após uma corrida de 60 minutos, a 95% do VO_2max . Nas culturas de PBMC totais foi observada redução da resposta proliferativa após o exercício. Contudo, nas culturas livres de células NK não houve efeito do exercício na resposta proliferativa ao estímulo com PHA. Esses resultados sugerem que a função dos linfócitos (proliferação) não é alterada pelo exercício. Este estudo sugere que um fator interferente na mensuração da capacidade proliferativa de linfócitos após o exercício parece ser a distribuição relativa das subpopulações de linfócitos, que é modificada pelo exercício. Vários estudos têm relatado que as células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ em contagem total de linfócitos são reduzidas durante o exercício, enquanto que as células $CD16^+$ e células NK aumentam (PEDERSEN *et al*, 1994). Assim, a resposta proliferativa dos linfócitos suprimida após estimulação com mitógeno pode indicar que as células NK aumentaram mais do que as células T após o exercício.

Nossos resultados sugerem que a composição relativa das PBMC utilizadas nos ensaios de proliferação pode ter sido alterada em função do exercício, já que o percentual de células CD4⁺ e CD19⁺, mas não de células CD8⁺, foi menor após o HIIE. Embora não tenhamos realizado a marcação específica para a quantificação de células NK (CD3⁻CD56⁺CD16⁺), verificamos também que a frequência de células que expressam baixos níveis de CD8, que podem ser células NK, foi maior após o exercício (dados não mostrados). Como as células NK não respondem ao estímulo superantigênico, a resposta proliferativa foi então menor, mas não necessariamente porque os linfócitos tiveram sua resposta funcional reduzida, e sim por estarem em menor proporção na cultura celular. A favor desta hipótese observamos também aumento da frequência de células localizadas em M1, que não proliferaram após 5 dias de estímulo superantigênico, após o HIIE. Assim, é possível que a reduzida resposta proliferativa observada após o HIIE pode não ser decorrente de alterações na função de linfócitos, mas sim reflexo da alteração da composição relativa das PBMC em resposta ao exercício, apesar do HIIE ter induzido, nas PBMC, desequilíbrio redox.

7.0 Conclusão

Nossos resultados mostram, portanto que, apesar do HIIE promover desequilíbrio redox nas PBMC, a resposta dos linfócitos ao estímulo superantigênico não é alterada. A redução da resposta proliferativa é, possivelmente, reflexo da alteração da distribuição das subpopulações linfocitárias em decorrência do HIIE.

8.0 Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular & Molecular*; Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2011.

ALARI-PAHISSA, E.; NOTARIO, L.; LORENTE, E.; VEGA-RAMOS, J.; JUSTEL, A.; *et al.* CD69 Does Not Affect the Extent of T Cell Priming. *PLOS ONE*, v. 7, n. 10, 48593, 2012.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE POSITION STAND. Exercise and Fluid Replacement. *Medicine Science Sports Exercise*, v. 39, n. 2, p. 377-390, 2007.

ANGULO, R.; FULCHER, D.A. Measurement of *Candida*-specific blastogenesis: comparison of carboxyfluorescein succinimidyl ester labelling of T cells, thymidine incorporation, and CD69 expression. *Cytometry*, v. 34, p. 143-151, 1998.

ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research & Therapy*, v. 11, n. 6, p. 1-8, 2009.

BALADY; GARY, J. *et al.* Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 239p., 2003.

BALKE, B.; WARE, R.W. An experimental study of physical fitness of Air Force personnel. *United States Armed Forces Medical Journal*, v. 10, n. 6, p. 675-688, 1959.

BANERJEE, A.K.; MANDAL, A.; CHANDA, D.; CHAKRABORTI, S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 253, p. 307–312, 2003.

BARTEN, M.J.; GUMMERT, J.F.; VANGELDER, T.; SHORTHOUSE, R.; MORRIS, R.E. Flow cytometric quantitation of calcium-dependent and -independent mitogen-stimulation of T cell functions in whole blood: inhibition by immunosuppressive drugs in vitro. *Journal of Immunological Methods*, v. 253, n. 1-2, p. 95–112, 2001.

BIERER, B.E.; BARBOSA, J.; HERRMANN, S.; BURAKOFF, S.J. Interaction of CD2 with its ligand, LFA-3, in human T cell proliferation. *The Journal of Immunology*, v. 140, n.10, p.3358-63, 1988.

BLOOMER, R.J.; GOLDFARB, A.H.; WIDEMAN, L.; MCKENZIE, M.J.; CONSITT, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, v. 19, n. 2, p. 276-85, 2005.

BLOOMER, R.J. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Medicine*, v. 37, n. 6, p. 519-32, 2007.

BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, M.C.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. A simple technique for simultaneous human leukocytes separation. *Journal of Immunology Methods*, v. 40, n. 1, p.115-116. 1981.

BONILLA, F.A.; OETTGEN, H.C. Adaptive immunity. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, v. 125, p. S33-40, 2010.

BOGDANIS, G.C.; STAVRINO, P.; FATOUROS, I.G.; PHILIPPOU, A.; CHATZINIKOLAOU, A.; DRAGANIDIS, D.; ERMIDIS, G.; MARIDAKI, M. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food and Chemical Toxicology*, v. 61, p. 171–177, 2013.

BORREGO, F.; ROBERTSON, M.J.; RITZ, J.; PEÑA, J.; SOLANA, R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*, v. 97, n. 1, p. 159-65, 1999.

BOYMAN, O.; PURTON, J.F.; SURH, C.D.; SPRENT, J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Current Opinion in Immunology*, v. 19, n. 3, p. 320-6, 2007.

BUDD, R. Activation-induced cell death. *Current Opinion in Immunology*, v. 13, p. 356–362, 2001.

BURKE, T.M.; WOLIN, M.S. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *American Journal of Physiology*, v. 252, n. 4, p. 721-32, 1987.

BURGOMASTER, K.A.; HUGHES, S.C.; HEIGENHAUSER, G.J.; BRADWELL, S.N.; GIBALA, M.J. Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential

and cycle endurance capacity in humans. *Journal of Applied Physiology*, v. 98, p. 1985–1990, 2005.

BURGOMASTER, K.A.; HEIGENHAUSER, G.J.; GIBALA, M.J. Effect of short-term sprint interval training on human skeletal muscle carbohydrate metabolism during exercise and time-trial performance. *Journal of Applied Physiology*, v. 100, p. 2041–2047, 2006.

BURGOMASTER, K.A.; HOWARTH, K.R.; PHILLIPS, S.M.; RAKOBOWCHUKM; MACDONALD, M.J.; MCGEE, S.L.; GIBALA, M.J. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *The Journal of Physiology*, v. 586.1, p. 151–160, 2008.

CARUSO, A.; LICENZIATI, A.; CORULLI, M. *et al.* Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. *Cytometry*, v. 27, p. 71–76, 1997.

CELERMAJER, D.S.; SORENSEN, K.E.; BULL, C.; ROBINSON, J.; DEANFIELD, J.E. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 24, p.1468–1474, 1994.

CODOÑER-FRANCH, P.; VALLS-BELLÉS, V.; ARILLA-CODOÑER, A.; ALONSO-IGLESIAS, E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*, v. 158, n. 6, p.369-84, 2011.

CUEVAS, M.J.; ALMAR, M.; GARCIA-GLEZ, J.C.; GARCIA-LOPEZ, D.; DE PAZ, J.A.; ALVEAR-ORDENES, I. *et al.* Changes in oxidative stress markers and NF-kappaB activation induced by sprint exercise. *Free Radical Research*, v. 39, n. 4, p. 431-9, 2005.

DAVIES, K.J.A.; QUINTANILHAT, A.T.; BROOKS, G.A.; PACKERT, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 107, n. 4, p. 1198-1205, 1982.

DELLABONA, P.; PECCOUD, J.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. *Cell*, v. 62, n. 6, p. 1115-21, 1990.

DE LA FUENTE, M.; HERNANZ, A.; VALLEJO, M.C. The immune system in the oxidative stress conditions of aging and hypertension: favorable effects of antioxidants and physical exercise. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, n. 9-10, p. 1356-66, 2005.

DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. *The Cytokine Handbook*. San Diego, CA: Academic, p. 491–516, 1998.

DILLARD, C.J. *et al.* Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*, v.45, p.927-932, 1978.

DILL, D.B.; COSTILL, D.L. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *Journal of Applied Physiology*, v. 37, n. 2, p. 247-248, 1974.

FERREIRA, C.K.O.; PRESTES, J.; FROLLINI, A.B.; DONATTO, F.F.; DIAS, R.; GUERESCHI, M.G.; BRANBILLA, S.; BOAVENTURA, M.; PITHON-CURI, T.; CURI, R.; VERLENGIA, R.; PALANCH, A.C.; CAVAGLIERI, C.R. Influence of short duration acute exercise on the number, viability, functionality and apoptosis of neutrophils in sedentary rats. *J Exerc Physiol Online*, v. 10, n. 6, p. 27-36, 2007.

FERRER, M.D.; TAULER, P.; SUREDA, A.; TUR, J.A.; PONS, A. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *Journal of Sports Sciences*, v. 27, n. 1, p. 49-58, 2009.

FISCHER, H.; GJORLOFF, A.; HEDLUND, G.; HEDMAN, H.; LUNDGREN, E.; KALLAND, T.; SJOGREN, H.O.; DOHLSTEN, M. Stimulation of human naïve and memory t helper cells with bacterial superantigen. Naïve CD4+45RA+ T cells require a costimulatory signal mediated through the LFA-1/CAM-1 pathway. *The Journal of Immunology*, v. 148, n. 7, p. 1993-8, 1992.

FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, v. 8, n. 1, p. 1-25, 2009.

FISHER, G.; SCHWARTZ, D.D.; QUINDRY, J.; BARBERIO, M.D.; FOSTER, E.B.; JONES, K.W.; PASCOE, D.D. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 110, p. 730-737, 2011.

FLEISHCHER, B.; SCHREZENMEIER, H.; CONRADT, H. T lymphocyte activation by staphylococcal enterotoxins: role of class II molecules and cell surface structures. *Cellular Immunology*, v. 144, p. 892, 1989.

FRISINA, J.; GAUDIERI, S.; CABLE, T.; KEAST, D.; PALMER, T. Effect of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. *International Journal of Sports Medicine*, v. 15, p. 36–41, 1994.

FRY, R.W.; MORTON, A.R.; CRAWFORD, G.P.; KEAST, D. Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *European Journal of Applied Physiology*, v. 64, p. 218±227, 1992a.

FRY, R.W.; MORTON, A.R.; KEAST, D. Acute intensive interval training and T-lymphocyte function. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 24, p. 339-345, 1992b.

FULLER, C.L.; BRACIALE, V.L. Selective induction of CD8+ cytotoxic t lymphocyte effector function by Staphylococcus enterotoxin B. *The Journal of Immunology*, v. 161, n. 10, p. 5179-86, 1998.

GAFFEN, S.L. Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine*, v. 14, p. 63-77, 2001.

GANGULY, T.; BANDHEKA, L.P.; SAINIS, K.B. Immunomodulatory effect of *Tylophora indica* on Con A induced lymphoproliferation. *Phytomedicine*, v. 8, n. 6, p. 431–437, 2001.

GIBALA, M.J.; LITTLE, J.P.; MACDONALD, M.J.; HAWLEY, J.A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *Journal of Physiology*, v. 1, n. 590, p. 1077-84, 2012.

GIBALA, M.J.; LITTLE, J.P.; VAN ESSEN, M.; WILKIN, G.P.; BURGOMASTER, K.A.; SAFDAR, A.; RAHA, S.; TARNOPOLSKY, M.A. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *Journal of Physiology*, v. 575, p. 901–911, 2006.

GIBALA, M.J.; MCGEE, S. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exercise and Sport Sciences Reviews*, v. 36, p. 58 – 63, 2008.

GILLEN, J.B.; GIBALA, M.J. Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? *Applied Physiology Nutrition Metabolism*, v. 39, p. 409–412, 2014.

GJORLOFF, A.; HEDLUND, G.; KALLAND, T.; SANSOM, D.; FISCHER, H.; TROWSDALE, J.; SJOGREN, H.O.; DOHLSTEN, M. The LFA-3 adhesion pathway is differently utilized by superantigen-activated human CD4⁺ T-cell subsets. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 36, n. 2, p. 243-50, 1992.

GLEESON, M.; BISHOP, N.; OLIVEIRA, M.; TAULER, P. Influence of training load on upper respiratory tract infection incidence and antigen-stimulated cytokine production. *Scand. Journal of Science and Medicine in Sports*, v. 23, p. 451–457, 2013.

GODIN, G.; DESHARNAIS, R.; VALOIS, P.; LEPAGE, L.; JOBIN, J.; BRADET, R. Differences in perceived barriers to exercise between high and low intenders: observations among different populations. *American Journal of Health Promotion*, v. 8, p. 279–284, 1994.

GRAY, A.B.; SMART, Y.C.; TELFORD, R.D.; WEIDEMANN, M.J.; ROBERTS, T.K. Anaerobic exercise causes transient changes in leukocyte subsets and IL-2R expression. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 24, p. 1332± 1338, 1992.

GREEN, K.J.; ROWBOTTOM, D.G.; MACKINNON, L.T. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *Journal of Applied Physiology*, v. 92, n. 6, p. 2390-5, 2002.

GREEN, K.J.; ROWBOTTOM, D.G.; MACKINNON, L.T. Acute Exercise and T-Lymphocyte Expression of the Early Activation Marker CD69. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 35, n. 4, p. 582–588, 2003.

GUDMUNDSDOTTIR, H.; WELLS, A.D.; TURKA, L.A. Dynamics and requirements of T cell clonal expansion in vivo at the single-cell level: effector function is linked to proliferative capacity. *Journal of Immunology*, v. 162, p. 5212-5223, 1999.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect*, v.102, suppl. 10, p.5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. Publicado por *Oxford University Press*. 4^a ed. 2007.

HARDING, F.A.; MCARTHUR, J.G.; GROSS, J.A.; RAULET, D.H.; ALLISON, J.P. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*, v. 356, n. 6370, p. 607-9, 1992.

HEHNER, S.P.; BREITKREUTZ, R.; SHUBINSKY, G.; UNSOELD, H.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SCHMITZ, M.L.; DROGE, W. Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *Journal of Immunology*, v.165, n.8, p.4319-4328, 2000.

HERRMANN, T.; BASCHIERI, S.; LEES, R.K.; MACDONALD, H.R. In vivo responses of CD4⁺ and CD8⁺ cells to bacterial superantigens. *European Journal of Immunology*, v. 22, n. 7, p. 1935-8, 1992.

HINTON, J.R.; ROWBOTTOM, D.G.; KEAST, D.; MORTON, A.R. Acute intensive interval training and in vitro t-lymphocyte function. *International Journal of Sports Medicine*, v. 18, n. 2, p. 130-5, 1997.

IBFELT, T.; PETERSEN, E.W.; BRUUNSGAARD, H.; SANDMAND, M.; PEDERSEN, B.K. Exercise-induced change in type 1 cytokine-producing CD8⁺ T cells is related to a decrease in memory T cells. *Journal of Applied Physiology*, v. 93, p. 645–648, 2002.

JACKSON, A.S.; POLLOCK, M.L. Generalized equations for predicting body density of men. *British Journal of Nutrition*, v.40, p.497–504, 1978.

JU, L. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine*, v. 222, p. 283 -92, 1999.

KAPPLER, J.; KOTZIN, B.; HERRON, L.; GELFAND, E.W.; BIGLER, R.D.; BOYLSTON, A.; CARREL, S.; POSNETT, D.N.; CHOI, Y.; MARRACK, P. V beta-specific stimulation of human T cell by staphylococcal toxins. *Science*, v. 244, n. 4906, p. 811-3, 1989.

KOHUT, M.L.; BOEHM, G.W.; MOYNIHAN, J.A. Prolonged exercise suppresses antigen-specific cytokine response to upper respiratory infection. *Journal of Applied Physiology*, v. 90, n. 2, p. 678-84, 2001.

KORKIAKANGAS, E.E.; ALAHUHTA, M.A.; LAITINEN, J.H. Barriers to regular exercise among adults at high risk or diagnosed with type 2 diabetes: a systematic review. *Health Promotion International*, v. 24, n. 4, p. 416-27, 2009.

KOYASU, S.; LAWTON, T.; NOVICK, D.; RECNY, M.A.; SILICIANO, R.F.; WALLNER, B.P.; REINHERZ, E.L. Role of interaction of CD2 molecules with lymphocyte function-associated antigen 3 in T-cell recognition of nominal antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 7, p. 2603-7, 1990.

LANDO, P.A.; DOHLSTEN, M.; HEDLUND, G.; AKERBLOM, E.; KALLAND, T. T cell killing of human colon carcinomas by monoclonal-antibody-targeted superantigens. *Cancer Immunol Immunother*, v. 36, p. 223-228, 1993.

LEWICKI, R.; TCHÓRZEWSKI, H.; MAJEWSKA, E.; NOWAK, Z.; BAJ, Z. Effect of maximal physical exercise on T-lymphocyte subpopulations and on interleukin 1 (IL 1) and interleukin 2 (IL 2) production in vitro. *International Journal of Sports Medicine*, v. 9, n. 2, p. 114-7, 1988.

LILIUS, E.M.; MARNILA, P. Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia*, v. 48, p. 1082-1091, 1992.

LITTLE, J.P.; SAFDAR, A.; WILKIN, G.P.; TARNOPOLSKY, M.A.; GIBALA, M.J. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *Journal of Physiology*, v. 588, p. 1011–1022, 2010.

LYONS, A.B. Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology*, v. 77, p. 509–515, 1999.

MACKINNON, L. Exercise and Immunology. Champaign, Illinois, USA: *Human Kinetics*, 1992.

MACKINNON, L.T. Immunity in athletes. *International Journal of Sports Medicine*, v. 18, p. 62–68, 1997.

MACKINNON, L.T. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunology Cell Biology*, v. 78, n. 5, p. 502-509, 2000.

MACNEIL, B.; HOFFMAN-GOETZ, L.; KENDALL, A.; HOUSTON, M.; ATUMUGAM, Y. Lymphocyte proliferation responses after exercise in men: fitness, intensity, and duration effects. *Journal of Applied Physiology*, v. 70, p. 179–185, 1991.

MAINO, V.C.; SUNI, M.A.; RUITENBERG, J.J. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*, v. 20, p. 127–33, 1995.

MANDAVILLI, B.S.; JANES, M.S. Detection of intracellular glutathione using ThioTracker violet stain and fluorescence microscopy. *Current Protocols in Cytometry*, Cap 9: Unid 9, 35; 2010.

MARDINEY, M.; BROWN, M.; FLEISHER, T. Measurement of T-cell CD69 expression: a rapid and efficient means to assess mitogen or antigen-induced proliferative capacity in normals. *Cytometry*, v. 26, p. 305–310, 1996.

MOREIRA, A.; DELGADO, L.; MOREIRA, P.; HAAHTELA, T. Does exercise increase the risk of upper respiratory tract infections? *British Medical Bulletin*, v. 90, p. 111–131, 2009.

MORETTA, A.; POGGI, A.; PENDE, D.; TRIPODI, G.; ORENTO, A.M.; PELLAN; AUGUGLIARO, R.; BOTTINO, C.; CICCONE, E.; MORETTA, L. CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *Journal of Experimental Medicine*, v. 174, n. 6, p. 1393-8, 1991.

MOSMANN, T.R.; LI, L.; HENGARTNER, H.; KAGI, D.; FU, W.; SAD, S. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp*, v. 204, p. 148-154, 1997.

MYERS, J.; DO, D.; HERBERT, W.; RIBISL, P.; FROELICHER, V.F. A nomogram to predict exercise capacity from a specific activity questionnaire and clinical data. *American Journal of Cardiology*, v. 73, n. 8, p. 591-6, 1994.

NAVALTA, J.W.; SEDLOCK, D.A.; PARK, K.S. Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *International Journal of Sports Medicine*, v. 28, n. 6, p. 539-42, 2007.

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, v. 49, p. 474-478, 1972.

NIEMAN, D.C.; JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W.; CERMAK, J.; ARABATZIS, K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *Journal of Sports Medicine And Physical Fitness*, v. 30, p. 316-328, 1990.

NIEMAN, D.C.; HENSON, D.A.; GUSEWITCH, G. *et al.* Physical activity and immune function in elderly women. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 25, p. 823-831, 1993.

NIEMAN, D.C.; MILLER, A.R.; HENSON, D.A.; WARREN, B.J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R.L.; DAVIS, J.M.; BUTTERWORTH, D.E.; HERRING, J.L.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *International Journal of Sports Medicine*, v. 15, n. 4, p. 199-206, 1994.

NIEMAN, D.C.; DAVIS, J.M.; BROWN, V.A. *et al.* Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2 h of intensive resistance training. *Journal of Applied Physiology*, v. 96, p. 1292-1298, 2004.

NIEMAN, D.C.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L.; HENSON, D.A. *et al.* Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 30, p. 679-686, 1998.

NIEMAN, D.C.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L.; FAGOAGA, O.R. *et al.* Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 84, p. 1252-1259, 1998.

NIEMAN, D. Immune response to heavy exertion. *Journal of Applied Physiology*, v. 82, n. 5, p. 1385-1394, 1997.

- NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise and immune function: recent developments. *Sports Medicine*, v. 27, n. 2, p. 73-80, 1999.
- NIESS, A.M. *et al.* DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International Journal of Sports Medicine*, v.17, n.6, p.397-403, 1996.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358, 1979.
- PARRA, E.; VARGA, M.; HEDLUND, G.; KALLAND, T.; DOHLSTEN, M. Costimulation by B7-1 and LFA-3 targets distinct nuclear factors that bind to the interleukin-2 promoter: B7-1 negatively regulates LFA-3 induced NF-AT DNA binding. *Molecular and Cell Biology*, v. 17, n. 3, p. 1314-23, 1997.
- PASCHALIS, V.; NIKOLAIDIS, M.G.; FATOUROS, I.G.; GIAKAS, G.; KOUTEDAKIS, Y.; KARATZAFERI, C. *et al.* Uniform and prolonged changes in blood oxidative stress after muscle-damaging exercise. *In Vivo*, v. 21, n. 5, p. 877-83, 2007.
- PEDERSEN, B.K.; TVEDE, N.; HANSEN, F.R.; ANDERSEN, V.; BENDIX, T.; BENDIXEN, G.; BENDTZEN, K.; GALBO, H.; HAAHR, P.M.; KLARLUND, K.; SYLVEST, J.; THOMSEN, B.S.; HALKJÆR-KRISTENSEN, J. Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. *Scandinavian Journal Immunology*, v. 27, p. 673–678, 1988.
- PEDERSEN, B.K.; TVEDE, N.; KLARLUND, K.; CHRISTENSEN, L.D.; HANSEN, F.R.; GALBO, H.; KHARAZMI, A.; HALKJÆR-KRISTENSEN, J. Indomethacin in vitro and in vivo abolishes post-exercise suppression of natural killer cell activity in peripheral blood. *International Journal of Sports Medicine*, v. 11, p. 127–131, 1990.
- PEDERSEN, B.K. Influence of physical activity on the cellular immune system: mechanism of action. *International Journal of Sports Medicine*, v. 12, p. S23–S29, 1991.
- PEDERSEN, B.K.; KAPPEL, M.; KLOKKER, M.; NIELSEN, H.B.; SECHER, N.H. The immune system during exposure to extreme physiologic conditions. *International Journal of Sports Medicine*, v. 15, p. S116-121, 1994.

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

PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British Journal of Sports Medicine*, v. 34, n. 4, p. 246-251, 2000.

PEDERSEN, B.K.; FISCHER, C.P. Beneficial health effects of exercise – the role of IL-6 as a myokine. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, v. 28, n. 4, p. 152-156, 2007.

PETERS, E.M.; BATEMAN, E.D. Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey. *South African Medical Journal*, v. 64, p. 582–584, 1983.

PETERS, E.M. The effect of altitude on the incidence of upper respiratory tract infections following participation in ultramarathon events (Abstract). *South African Sports Medicine*, v. 5, p. 4–8, 1990.

POWERS, S.K.; LENNON, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 58, p. 1025–1033, 1999.

PRESTES, J.; FOSCHINI, D.; DONATTO, F.F. Physical exercises effect on the immune system. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 3, n. 7, p. 57-65, 2006.

PRESTES, J.; DIAS, R.; DONATTO, F.F.; FERREIRA, C.K.O.; FOSCHINI, D.; FROLLINI, A.B.; GUERESCHI, M.G.; PALANCH, A.C.; JÚNIOR, A.F.; CAVAGLIERI, C.R. Effects of two acute exercise sessions performed in the same day in different intensities on total leukocytes counting, circulating and tissue lymphocytes. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 3, n. 11, p. 27-33, 2007.

PRESTES, J.; FERREIRA, C.K.O.; DIAS, R.; FROLLINI, A.B.; DONATTO, F.F.; CURYBOAVENTURA, M.F.; GUERESCHI, M.G.; PITHON-CURI, T.C.; VERLENGIA, R.; PALANCH, A.C.; CURI, R.; CAVAGLIERI, C.R. Lymphocyte and Cytokines after Short Periods of Exercise. *International Journal of Sports Medicine*, v. 29, p. 1-5, 2008.

- PULLEN, A.M.; WADE, T.; MARRACK, P.; KAPPLER, J.W. Identification of the region of T cell receptor beta chain that interacts with the self-superantigen MIs-1a. *Cell*, v. 61, n. 7, p. 1365-74, 1990.
- PYNE, D.; GLEESON, M. Effects of intensive exercise training on immunity in athletes. *International Journal of Sports Medicine*, v. 19, p. S183–S194, 1998.
- RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise Immunology Review*, v.7, p.90–107, 2001.
- RAKOBOWCHUK, M.; TANGUAY, S.; BURGOMASTER, K.A.; HOWARTH, K.R.; GIBALA, M.J.; MACDONALD, M.J. Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 295, p. R236-R242, 2008.
- ROCHA, B.; LEMBEZAT, M.P.; FREITAS, A.; BANDEIRA, A. Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production in exponentially growing T cells: major differences between in vivo and in vitro proliferating T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, v. 19, p. 1137–1145, 1989.
- RONSEN O, PEDERSEN BK, ØRITSLAND TR, BAHR R, KJELDSSEN-KRAGHJ. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n. 1, p. 425-434, 2001.
- SCHWARTZ, R.H.; MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; QUILL, H. T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 54, n. 2, p. 605-10, 1989.
- SCHWARTZ, R.H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*, v. 248, n. 4961, p. 1349-56, 1990.
- SCHWARTZ, R.H. Costimulation of T lymphocyte: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell*, v. 71, p. 1065, 1992.
- SCHLIEVERT, P.M. Role of superantigens in human disease. *Journal of Infectious Diseases*, v. 167, n. 5, p. 997-1002, 1993.

SHEPHARD, R.J.; RHIND, S.; SHEK, P.N. Exercise and the immune system. Natural killer cells, interleukins and related responses. *Journal of Sports Medicine*, v. 18, p. 340–369, 1994.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.62, p.1315S-1321, 1995.

SIES, H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. *Experimental Physiology*, v. 82, p.291-295, 1997.

SOUZA Jr, T.P.; OLIVEIRA, P.R.; PEREIRA, B. Efeitos do exercicio fisico intenso sobre a quimioluminescencia urinaria e malonaldeido plasmatico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, v. 11, n. 1, p. 91-6, 2005.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRASEKAR, B.; GU, Y.; LUO, J.; HAMID, T.; HILL, B.G.; PRABHU, S.D. Downregulation of CuZn-superoxide dismutase contributes to β -adrenergic receptor-mediated oxidative stress in the heart. *Cardiovascular Research*, v. 74, n. 3, p. 445-55, 2007.

SUREDA, A.; FERRER, M.D.; TAULER, P.; ROMAGUERA, D.; DROBNIC, F.; PUJOL, P.; TUR, J.A. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *British journal of sports medicine*, v. 43, n. 3, p. 186-90, 2009.

SUWAIDI, J.A.; HAMASAKI, S.; HIGANO, S.T.; NISHIMURA, R.A.; HOLMES, D.R.; JR & LERMMAN, A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endotelial dysfunction. *Circulation*, v.101, p. 948–954, 2000.

TAULER, P.; AGUILÓ, A.; GIMENO, I.; GUIX, P.; TUR, J.A.; PONS, A. Different effects of exercise testes on the antioxidant enzyme activities in lymphocytes and neutrophils. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 15, p. 479-484, 2004.

TAULER, P.; SUREDA, A.; CASES, N.; AGUILO, A.; RODRIGUEZMARROYO, J.; VILLA, G.; TUR, J. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 17, n. 10, p. 665-671, 2006.

TESTI, R.; PHILLIPS, J.; LANIER, L. Leu 23 induction as an early marker of functional CD3/T cell antigen receptor triggering. *The Journal of Immunology*, v. 142, p. 1954–1860, 1989. (a)

TESTI, R.; PHILLIPS, J.; LANIER, L. T cell activation via Leu23 (CD69). *The Journal of Immunology*, v. 143, p. 1123–1128, 1989. (b)

TROST, S.G.; OWEN, N.; BAUMAN, A.E.; SALLIS, J.F.; BROWN, W. Correlates of adults participation in physical activity: review and update. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v.34, p.1996–2001, 2002.

TSENG, S.Y.; DUSTIN, M.L. T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 14, p. 575-580, 2002.

TURVEY, S.E.; BROIDE, D.H. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, p.S24-32, 2010.

TVEDE, N.; PEDERSEN, B.K.; HANSEN, F.R.; BENDIX, T.; CHRISTENSEN, L.D.; GALBO, H.; HALKJÆR-KRISTENSEN, J. Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 29, p. 383–389, 1989.

TVEDE, N.; KAPPEL, M.; HALKJÆR-KRISTENSEN, J.; GALBO, H.; PEDERSEN, B.K. The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *International Journal of Sports Medicine*, v. 14, p. 275–282, 1993.

TVEDE, N.; KAPPEL, M.; KLARLUND, K.; DUHN, S.; HALKJÆR-KRISTENSEN, J.; KJÆR, M.; GALBO, H.; PEDERSEN, B. Evidence that the effect of bicycle exercise on blood mononuclear cell proliferative responses and subsets is mediated by epinephrine. *International Journal of Sports Medicine*, v. 15, p. 100-104, 1994.

VAN SEVENTER, G.A.; SHIMIZU, Y.; HORGAN, K.J.; SHAW, S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *The Journal of Immunology*, v. 144, n. 12, p. 4579-86, 1990.

VIDER, J.; LEHTMAA, J.; KULLISAAR, T.; VIHALEMM, T.; ZILMER, K.; KAIRANE, C.; LANDÖR, A. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*, v. 7, n. 4, p. 263-270, 2001.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHOU, X.Y.; YASHIRO-OHTANI, Y.; NAKAHIRA, M.; PARK, W.R.; ABE, R.; HAMAOKA, T.; NARAMURA, M.; GU, H.; FUJIWARA, H. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL2 promoter activation. *The Journal of Immunology*, v. 168, p. 3847-3854, 2002.

ZWETSLOOT, K.A.; JOHN, C.S.; LAWRENCE, M.M.; BATTISTA, R.A.; SHANELY, R.A. High-intensity interval training induces a modest systemic inflammatory response in active, young men. *Journal of Inflammation Research*, v. 7, p. 9–17, 2014.

WANG, J.S.; HUANG, Y.H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *European Journal Applied Physiology*, v. 95, n. 4, p. 290-7, 2005.

WEINSTOCK, C.; KÖNIG, D.; HARNISCHMACHER, R.; KEUL, J.; BERG, A.; NORTHOFF, H. Effect of exhaustive exercise stress on the cytokine response. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, v. 29, n. 3, p. 345-354, 1997.

WHITE, J.; HERMAN, A.; PULLEN, A.M.; KUBO, R.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P. The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*, v. 56, n. 1, p. 27-35, 1989.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de esclarecimento

Projeto de pesquisa

Participação do estresse oxidativo na imunossupressão induzida pelo exercício de alta intensidade: avaliação do efeito de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade sobre a função de linfócitos e neutrófilos.

O objetivo do presente estudo é avaliar se o estresse oxidativo (produção de radicais livres) participa da diminuição das funções de neutrófilos e linfócitos induzida pelo exercício de alta intensidade, para o qual você foi escolhido por ser homem, ter entre 20 e 39 anos, ser fisicamente ativos, não reportar doença infecciosa, autoimune, crônico degenerativa ou de hipersensibilidade e que não esteja fazendo uso de medicamentos com ação antiinflamatória no período do estudo.

Sua participação no estudo consistirá em doar 10 mL de sangue, que será coletado por punção venosa com tubos a vácuo (da mesma maneira que é coletado quando você faz algum exame de sangue), em data e horário a combinar. A partir do sangue serão obtidos os linfócitos para os experimentos em laboratório. Os riscos de sua participação incluem hematoma (roxo no local da coleta de sangue), dor, tontura, enjôo e de contaminação. A coleta será feita por pessoa treinada, em local limpo e reservado, equipado com maca, utilizando material estéril e descartável. Ao doar seu sangue para este projeto você estará contribuindo para o entendimento de como a produção de radicais livres participa da diminuição das funções do sistema imune (sistema de defesa). Os seus dados serão mantidos em sigilo e sua identidade não será revelada. Só os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa e divulgação científica em congressos, livros e revistas. Não está prevista qualquer forma de remuneração pela sua participação no estudo e você não terá nenhuma despesa (portanto, não está previsto nenhuma forma de ressarcimento). Quaisquer dúvidas que possam surgir durante o andamento deste estudo por parte do voluntário poderão ser esclarecidas junto aos membros da equipe responsáveis pelo projeto, pessoalmente ou por telefone. Você poderá recusar e/ou deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem nenhum constrangimento ou prejuízo na sua relação com os pesquisadores e a UFVJM. Os pesquisadores responsáveis por este projeto podem decidir sobre a sua exclusão do estudo por razões científicas, a respeito das quais você deverá ser

devidamente informado. Em caso de qualquer dúvida deverá e/ou poderá entrar em contato a qualquer hora com a pesquisadora responsável Profa. Etel Rocha Vieira pelo telefone 38 35317814 (etelvieira@terra.com.br).

Termo de livre consentimento pós-informado

Eu discuti os riscos e benefícios da minha participação no estudo intitulado “Participação do estresse oxidativo na imunossupressão induzida pelo exercício de alta intensidade: avaliação do efeito de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade sobre a função de linfócitos e neutrófilos.” com os pesquisadores envolvidos. Eu li e compreendi todos os procedimentos que envolvem esta pesquisa e tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Eu perguntei e obtive as respostas para todas as minhas dúvidas. Eu sei que posso me recusar a participar deste estudo ou que posso abandoná-lo a qualquer momento sem qualquer constrangimento ou prejuízo. Eu também compreendo que os pesquisadores podem decidir sobre a minha exclusão do estudo por razões científicas, sobre as quais eu serei devidamente informado. Não terei nenhuma remuneração e nenhum gasto por participar do projeto. Tenho uma cópia deste formulário, o qual foi assinado em duas vias idênticas e rubricadas.

Portanto, aqui forneço o meu consentimento para participar do estudo intitulado “Participação do estresse oxidativo na imunossupressão induzida pelo exercício de alta intensidade: avaliação do efeito de uma sessão de exercício intervalado de alta intensidade sobre a função de linfócitos e neutrófilos.” durante todos os testes realizados.

Diamantina, _____

Assinatura do voluntário: _____

Testemunha: _____

Testemunha: _____

Declaro que expliquei todos os objetivos, benefícios e riscos deste estudo ao voluntário, dentro dos limites de meus conhecimentos científicos.

Pesquisador responsável: _____

Etel Rocha Vieira

Comitê de Ética em Pesquisa da UFVJM

Campus JK – Alto da Jacuba - Diamantina

Coordenação: Prof^ª. Thais Machado Gaiad

(38) 35321240

cep.secretaria@ufvjm.edu.br



ANEXO 2

Questionário sobre Prontidão para Atividade Física (ACSM, 2000) PAR – Q

1 - Seu médico já mencionou alguma vez que você tem uma condição cardíaca e que você só deve realizar atividade física recomendada por um médico ?

() Sim () Não

2 – Você sente dor no tórax quando realiza atividade física ?

() Sim () Não

3 – No mês passado (ou num período recente), você teve dor torácica quando não estava realizando atividade física ?

() Sim () Não

4 – Você perdeu o equilíbrio por causa de tontura ou alguma vez perdeu a consciência ?

() Sim () Não

5 – Você tem algum problema ósseo ou de articulação que poderia piorar em consequência de uma alteração em sua atividade física ?

() Sim () Não

6 – Seu médico está prescrevendo medicamentos (Ex., pilulas) para sua pressão ou condição cardíaca ?

() Sim () Não

7 – Você conhece alguma outra razão que não o permita praticar atividade física?

() Sim () Não

Li, entendi e completei este questionário. Todas as dúvidas que tive foram respondidas satisfatoriamente.

Data: ___ / ___ / ___ Assinatura do responsável: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO 3

Fator de risco para doença coronariana (ACSM, 1998)

Fator	Descrição	Sim	Não
Idade	Homem acima de 45 ou mulher acima de 55 anos		
Colesterol	Acima de 240 mg/Dl		
Pressão arterial	Acima de 240/90 ou usa medicamento para pressão		
Tabagismo	Fuma?		
Diabetes	É diabético?		
História familiar	Pai ou irmão antes dos 55 ou, mãe ou irmã antes dos 65 anos com histórico de ataque cardíaco?		
Sedentarismo	Atividade profissional sedentária e menos de 30 min de atividade pelo menos 3 vezes por semana?		
Obesidade	Mais de 10kg de excesso de peso?		

Diamantina _____, de _____ de 20 .

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO 4

Versão brasileira do Veterans Specific Activity Questionnaire (VSAQ)

Este questionário tem como objetivo avaliar sua capacidade para realização de atividades diárias habituais. A seguir, serão apresentadas várias atividades do dia-a-dia que aumentam de modo crescente o nível de esforço e dificuldade necessários para realizá-las. Após a identificação das atividades, pense cuidadosamente e indique a primeira atividade que, se realizada por um determinado período (poucos minutos), causaria cansaço intenso, falta de ar, dor no peito ou vontade de parar por exaustão. Se você não realiza normalmente alguma das atividades em particular, tente imaginar como seria se as fizesse.

1 MET - Comer e vestir-se. Ficar deitado ou sentado assistindo televisão. Trabalhar sentado escrevendo, digitar no computador ou falar ao telefone.

2 METs - Lavar, passar ou pendurar roupas. Cozinhar, lavar pratos, mudar a roupa de cama, levar lixo para fora, regar plantas, costurar à mão. Tomar banho de chuveiro e secar-se (em pé). Caminhar da casa para o carro ou ônibus. Descer 8 degraus de escada (1 lance). Fazer compras (no mercado, no shopping). Carregar e arrumar as compras (esforço leve).

3 METs - Caminhar devagar (4km/h) sobre uma superfície plana um ou dois quarteirões (carregando ou não objetos com menos de 10 kg). Realizar trabalhos leves/moderados: lavar carro, lavar janelas, limpar garagem, varrer o chão, carregar criança pequena de aproximadamente 7 kg (esforço leve).

4 METs - Executar trabalhos leves no quintal (por exemplo: juntar e ensacar grama ou folhas de árvore). Varrer garagem, calçada ou fora de casa. Cuidar de idoso ou adulto incapacitado (ex.: ajudar a dar banho). Andar de bicicleta para trabalho ou lazer (< 16 km/h).

5 METs - Dançar socialmente (rápido). Caminhar, terreno plano, superfície firme, ritmo bem rápido (6,5 km/h). Caminhar carregando um peso entre 0,5 e 7 kg em subidas (ex.: pacote de arroz de 5 kg).

6 METs - Fazer faxina. Nadar, em lago, oceano ou rio. Caminhar (7 km/h) em terreno plano, superfície firme, ritmo extremamente rápido. Mudar móveis pesados de lugar (arrastar).

7 METs - Subir ladeira a pé. Futebol casual. Correr (7,5 km/h) ou nadar, em velocidade lenta, esforço leve a moderado. Carregar compras escada acima. Carregar um peso de aproximadamente 30 kg (uma criança).

8 METs - Correr 8 km/h, moderadamente, em superfícies planas (7,5 min.km⁻¹), subir escadas rapidamente. Carregar compras e pesos moderados (7 a 18 kg) subindo escadas.

9 METs - Andar de bicicleta em velocidade moderada. Correr 8,3 km/h (7,1 min. km⁻¹). Subir morros com peso de 20 kg.

10 METs - Nadar em ritmo acelerado, esforço vigoroso. Subir uma ladeira de bicicleta. Correr a 10 km por hora (6,2 min. km-1). Futebol competitivo. Carregar peso entre 22 e 34 kg em subidas.

11 METs - Andar de bicicleta em ritmo acelerado e contínuo. Correr 11 km/h (5,3 min. km-1) ou correr no campo (terreno irregular com subida). Nadar estilo crawl, velocidade rápida (70 m/min), com esforço vigoroso. Carregar uma carga pesada (ou seja, uma criança) subindo até 2 lances de escada.

12 METs - Correr em ritmo acelerado e contínuo (em superfície plana 2 km em tempo < 10 minutos ou 12 km/h). Ciclismo estacionário (250 W), esforço muito vigoroso. Carregar peso superior a 34 kg em subida.

13 METs - Realizar qualquer atividade competitiva, incluindo aquelas que envolvam correr a toda velocidade (muito rápido) e de forma intermitente. Correr a aproximadamente 13 km/h (4,6 min.km-1). Correr ou remar competitivamente, corridas de bicicleta.