

## IMUNOMODULAÇÃO EM ATLETAS PROFISSIONAIS DE FUTSAL: FENOTIPAGEM LINFOCITÁRIA E NÍVEIS DE IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ E IFN- $\gamma$

*IMMUNOMODULATION IN PROFESSIONAL FUTSAL ATHLETES: LYMPHOCYTE PHENOTYPING AND LEVELS OF IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  AND IFN- $\gamma$*

### Autores

Renata DELLALIBERA-JOVILIANO<sup>1</sup>  
 Jaime Pereira de SOUZA-JÚNIOR<sup>2</sup>  
 Eduardo Vaz de OLIVEIRA<sup>3</sup>  
 Gabriel Ricci PUPO<sup>3</sup>  
 Drielle CHIESA<sup>4</sup>  
 Giovana Aparecida Pereira HERNANDES<sup>5</sup>

### Resumo

**Introdução.** Sabe-se que o sistema imunológico apresenta comportamentos variados com a prática de atividade física, porém pouco estudos tem associado a modalidade do futsal. **Objetivo.** Assim, quantificar perfis de citocinas e determinar a fenotipagem de linfócitos no sangue periférico de atletas profissionais do Futsal tornou-se o objetivo deste estudo. **Métodos.** Foram incluídos 9 atletas praticantes regulares do Futsal e 9 participantes da pesquisa sedentários para o grupo controle; ambos os grupos compostos por indivíduos do sexo feminino com idade entre 19 e 29 anos. Métodos imunoenzimáticos padronizados, foram determinadas as dosagens de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ; citometria de fluxo utilizamos para a determinar a fenotipagem linfocitária. **Resultados.** Os resultados mostram aumento dessas citocinas no plasma das atletas quando comparados aos indivíduos controle, possivelmente, associado à modificação do perfil leucocitário e liberação de cortisol. Além disso, os dados mostram aumento da expressão dos perfis celulares dos linfócitos T helper (CD3+CD4+CD8+) e citotóxico (CD3+CD4-CD8+) nas atletas. **Conclusão.** Em suma, esses resultados sugerem uma estimulação predominante do perfil linfocitário T helper associados a uma ativação imunológica na resposta adaptativa submetidos ao estímulo de citocinas.

**Palavras chaves:** Sistema imune; Citocinas; Futsal; Atividade física.

### Filiação

<sup>1</sup> PhD, pesquisadora e orientadora do Núcleo de Pesquisa e Programa de Iniciação Científica do Curso de Medicina, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto/SP.

<sup>2</sup> Educador Físico, Jaime Jr Funcional Training, Bebedouro/SP.

<sup>3</sup> Núcleo de Pesquisa e Programa de Iniciação Científica do Curso de Medicina, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto/SP.

<sup>4</sup> Fisioterapeuta, Hospital de Amor, Barretos/SP.

<sup>5</sup> Fisioterapeuta do Futsal Feminino SPFC - São Paulo Futebol Clube e Taboão da Serra/SP.

### Autor Correspondente

Profa Dra Renata Dellalibera-Joviliano, Núcleo de Pesquisa do Curso de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto, Campus de Ribeirão Preto. Avenida Costábile Romano, 2201, Bloco S, Sala 87S, Ribeirão Preto, Brasil. CEP:14096-900. Tel +55 (16) 99701 5371, e-Mail: [redellajov@gmail.com](mailto:redellajov@gmail.com)

### Abstract

**Introduction.** It is known that the immune system has varied behaviors with the practice of physical activity, but few studies have associated the modality of futsal. **Objective.** Thus, quantifying cytokine profiles and determining lymphocyte phenotyping in the peripheral blood of professional Futsal athletes became the goal of this study. **Methods.** We included 9 regular Futsal athletes and 9 sedentary subjects for the control group; both groups composed of female individuals aged between 19 and 29 years. Standardized immunoenzymatic methods, the dosages of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  cytokines were determined; flow cytometry we used to determine lymphocyte phenotyping. **Results.** The results show an increase of these cytokines in the plasma of the athletes when compared to the control individuals, possibly associated to the modification of the leukocyte profile and release of cortisol. In addition, the data show increased expression of helper (CD3 + CD4 + CD8 +) and cytotoxic (CD3 + CD4-CD8 +) T cell profiles in athletes. **Conclusion.** These results suggest a predominant stimulation of the T helper lymphocyte profile associated with an immune activation in the adaptive response submitted to cytokine stimulation.

**Keywords:** Immune System, Cytokines, Futsal, Physical Activity.

## INTRODUÇÃO

O sistema imunológico envolve interações complexas entre órgãos linfóide, células imunes e citocinas. Particularmente, as citocinas podem ser classificadas de acordo com sua função, isto é, pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Citocinas pró-inflamatórias estão associadas a ativação do processo inflamatório, como representado pela interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interferons (IFN), interleucina-2 (IL-2) e quimiocinas. As citocinas anti-inflamatórias caracterizam-se pelo controle da resposta inflamatório promovendo diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias; dentre elas destacam-se: a interleucina-10 (IL-10), TGF-beta, o receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra)<sup>1</sup>.

Embora os efeitos positivos para a saúde da atividade física sejam provavelmente mediados por vários mecanismos, sugere-se que um dos principais efeitos pelos quais o exercício físico e a prática regular de esportes podem mediar efeitos positivos para a saúde é através da modulação do sistema imunológico. O número crescente de estudos sobre exercício físico em diferentes modalidades e o sistema imune (SI) tem mostrado um importante efeito modulador da função de células no organismo como liberação de citocinas, hormônios (glicocorticóides capazes de promover efeito de adaptações metabólicas) além de promoverem efeitos hemodinâmicos que conduzem uma redistribuição de células de defesa.

O futsal, particularmente, é um esporte que denota exigências de trabalhos intensos anaeróbios. Semelhantemente ao futebol, o futsal é uma modalidade desportiva caracterizada por esforços intermitentes, extensão variada e periodicidade aleatória e, atualmente, exige esforços de grande intensidade e curta duração, diferenciando esta modalidade desportiva de outras de alto nível<sup>2,3,4</sup>.

O cortisol é um glicocorticóide cuja secreção ocorre no córtex suprarrenal a partir da liberação de ACTH adenohipofisário durante processos de estresse físico ou neurogênico, provocando aumento da concentração da glicemia através da diminuição do consumo de glicose pela célula tecidual e estimulação do processo gliconeogênico, ou seja, convertendo proteínas e a fração glicerol lipídica em glicose nos hepatócitos. Na circulação sistêmica, o cortisol promove modulação das células do SI como a redução do número e a atividade de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, e aumenta a produção eritrocitária, verificando-se policitemia quando em excesso e, na sua ausência, anemia<sup>5</sup>.

Faz-se necessário uma análise das alterações imunológicas antes, durante e após a atividade física, uma vez que, com base bibliográfica, o excesso de treinamento pode causar imunodepressão, prejudicando o programa de treinamento e o equilíbrio da resposta imunológica de atletas. Dentro deste contexto, considerando a interrelação fisiológica e atividade física, identificar o perfil da imunomodulação celular em atletas praticantes de futsal feminino pode ser considerado uma proposta para compreensão do sistema imune mediante a atividade esportiva. Mediante tais considerações, este trabalho teve como objetivo central a análise do perfil linfocitário T circulante, bem como a quantificação de citocinas (IL-1 beta, TNF-alfa e interferon-gama/IFN-gama) produzidas por estas células no sangue periférico, frente às alterações corpóreas da prática esportiva relacionando uma modalidade que envolve atividade física intensa. Este estudo é prospectivo e exploratório e busca acompanhar, descrever e comparar o comportamento das células do sistema imune de atletas de futsal, antes e após a prática esportiva.

## MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 9 atletas do sexo feminino, com idades entre 19-29 anos (média, 24 anos), brancas, praticantes da modalidade de futsal e provenientes de time profissional do norte paulista. Foram selecionadas também 9 mulheres sedentárias, que não praticavam atividade física ou esportiva, pareadas em termos de etnia e idade com as atletas, para compor o “grupo controle”.

Inicialmente, atletas do futsal e o grupo controle passaram por uma triagem pré-seleção onde foi realizado a coleta de informações através de um questionário estruturado relacionado à dieta alimentar (alimentação regular contendo 4 refeições e manutenção da hidratação), a possibilidade da frequência de processos patológicos das vias áreas respiratórias (gripes, resfriados, alergias, renites), todas apresentando pressão arterial normotensas (média 110x80mmHg). Critérios de exclusão adotado: uso de qualquer fármaco ou suplemento alimentar nos últimos 3 meses, ausência de doença crônica prévia, não serem fumantes ou estilistas, e não apresentassem quadro de lesão muscular ou qualquer outra resposta inflamatória num período inferior a 12 meses. O trabalho desenvolveu-se dentro de padrões éticos após aprovação do CEP (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - Res. CNS n.º 466/2012, Resolução n.º196/96 e Norma Operacional 001/2013).

### Procedimentos Experimentais

Os experimentos foram realizados em laboratórios vinculados pela pesquisadora junto a universidades do interior do Estado de São Paulo. As amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa, utilizando heparina como anticoagulante, para preservação das células leucocitárias e elementos figurados sanguíneos. Ainda, foi separada uma alíquota plasmática para a quantificação das citocinas.

É importante relatar que as atletas estavam no período de treinos para a participação de campeonatos esportivos no âmbito estadual, ou seja, também se encontravam em momentos considerados de estresse físico. Foram coletadas amostras de sangue de todos os grupos sendo que para as atletas em 2 momentos: (a) antes do início de treinamento esportivo (campeonato estadual) e (b) após o treinamento (finalizando o campeonato estadual, aproximadamente, após 60 dias em relação a primeira coleta). Para o grupo controle colheu-se somente uma amostra de sangue, considerando o perfil sedentário.

Citocinas: As dosagens citocinas foram determinadas utilizando métodos imunoenzimáticos padronizados com algumas modificações descrito por Dellalibera-Joviliano et al. em diferentes citações<sup>6,7,8,9</sup>. Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc). Todos os protocolos das citocinas mencionadas nos objetivos, seguiram de forma similar àqueles observados nas quantificações de IL-1 $\beta$ , utilizando anticorpos monoclonais específicos para as sensibilizações.

IL-1 beta: A dosagem de IL-1 $\beta$  foi realizada, utilizando-se como primeiro ligante, o anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$  humano (Pharmingen, EUA), sendo adicionados, a cada poço, 50  $\mu$ L de uma solução na concentração de 3  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 4° C durante 12 horas. Após a ligação do primeiro anticorpo, as placas foram novamente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, com solução bloqueadora, contendo albumina bovina a 1% (Merck, Alemanha). As placas foram então lavadas 4 vezes em tampão PBS-Tween. A seguir foram adicionados 80  $\mu$ L da citocina padrão e das amostras de plasma dos pacientes e a placa incubadas a 4° C overnight. A citocina padrão, IL-1 $\beta$  recombinante humano (Pharmingen, EUA), foi diluída em tampão bloqueador-Tween e utilizadas numa

concentração inicial de 2000 pg/mL. Foi então, diluída logaritmicamente em base 2, até atingir 1,9 pg/mL e, no último poço da primeira linha, foi feita o blank, possibilitando assim a realização de uma curva padrão. As amostras de plasmas analisadas foram tratadas antes do descongelamento com o coquetel inibidor de enzimas, com o intuito de inibir a degradação da citocinas durante o descongelamento. Após o descongelamento, 100µL do plasma foi adicionados aos poços e as placas incubadas novamente overnight. Na manhã seguinte, foi adicionado o segundo anticorpo anti-IL-1β humano (Pharmingen, EUA) biotinizado, no volume de 100 µL/poço de uma solução na concentração de 1 µg/mL, sendo as placas incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Foi então adicionada a solução contendo o conjugado avidina-peroxidase (SAV-HRP, Pharmingen), no volume de 100 µL/poço e na diluição de 1/5000. A avidina se liga à biotina presente no anticorpo anticitocina biotinizado. Após período de incubação de 1 hora, foi adicionado o-fenildiamino dihidroclorido, OPD (Sigma, EUA), 100 µL/poço de uma solução na concentração de 10 mg/mL, contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse substrato, ao sofrer a ação da enzima peroxidase, gera uma cor amarela. A reação foi bloqueada pela adição de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, 100 µL/poço, após ser observado nítido aparecimento da cor. A densidade óptica das placas foi determinada em espectrofotômetro a 490 nm, e a concentração de IL-1 nas amostras de plasma analisadas foi determinada a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL pela comparação da densidade óptica (DO) obtida com as da curva padrão. Enfatiza-se que as dosagens das demais citocinas estudadas foi realizada utilizando protocolo semelhante ao acima descrito, exceto no que se refere à natureza dos anticorpo de captura, detecção e a citocina padrão.

As soluções utilizadas para as dosagens das diversas citocinas incluem: Coquetel inativador de enzimas: 1) 100 mM ácido amino capróico (13,1 g); 2) 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA (3,72 g); 3) 5 mM benzamida HCl-H<sub>2</sub>O (0,78g); 4) 0,2 mM fenilmetilsulforil fluoride (PMSF) (0,035 g). Dissolver (1) ao (3) em 99 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Acrescentar o PMSF, previamente dissolvido em 1 mL de isopropanol, no momento de utilização deste coquetel, pois ele perde rapidamente sua atividade (cerca de 100 min. a partir da diluição). Solução de ligação: 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ajustar o pH para 9,0 com HCl (utilizada para diluir o anticorpo de captura).

Ensaio de proliferação celular: Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram purificadas a partir de sangue heparinizado (50U/mL) através de gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech). O sangue foi adicionado a Ficoll-Hypaque (1:1) e centrifugado a 300g por 30 minutos a 26°C. O anel de leucócitos foi retirado e lavado com RPMI, centrifugado a 300g por 10min a 5°C, sendo a seguir suspensos (106cels/ml) em meio RPMI 1640 suplementado com 1,6% L-glutamina, 3% antibiótico-antimicótico (10.000U de penicilina, 10.000 de estreptomina, e 5µg de anfotericina B), 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, os PBMC dos grupos estudados tiveram sua concentração acertada para 5x10<sup>6</sup> células/mL e foram cultivadas 100µL (5x10<sup>5</sup>/poço) em placas de 96 poços de fundo em "U" na presença de 100µL de estímulo policlonal, fitohemaglutinina (PHA, 1µg/mL) para amostra humanas. Após 4 dias, foram adicionados 0,5 µCi/poço de [<sup>3</sup>H] timidina (Amersham Biosciences) e a cultura mantida por 16 horas adicionais. A incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina foi avaliada através de contador de cintilação (Beckman Instruments).

Fenotipagem de Linfócitos: Para a caracterização fenotípica das células linfocitárias, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo (FACS). Para tal, em um tubo 5x10<sup>5</sup> PBMC foram suspensas em 100µl e incubadas com 40µl de anticorpo anti-FcR, bloqueador de receptores para porção Fc de imunoglobulinas (PBS 5% soro normal de coelho) durante 30

minutos, para evitar ligações inespecíficas. Em seguida, as suspensões celulares foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina) por 30 minutos, à 4°C, ao abrigo da luz. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com 100µl do tampão de FACS por tubo e centrifugadas durante 10 minutos a 400 g sobrenadante então foi retirado e o sedimento suspenso em 150µl de PBS contendo 1% de formaldeído, objetivando a fixação das células. Após estes procedimentos, as amostras foram adquiridas em FACSCanto™ (BD Immunocytometry System, San Jose, CA), permitindo analisar todas as células adquiridas (100.000 eventos/amostra) ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou "Gates") estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade / complexidade interna (SSC) ou fluorescências (FL).

Imunofenotipagem linfocitária no sangue periférico foi analisada por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos para a identificação das proteínas superficiais CD4 e CD8 (LThelper (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), LTcitotóxico (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>).

Citometria de Fluxo: A contagem das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi feita por um citômetro de fluxo FACSCanto™ via utilização de anticorpos monoclonais específicos conjugados a um determinado fluorocromo. Neste estudo, numa amostra de células submetidas ao protocolo de imunofenotipagem utilizou-se anti-CD8-FITC e anti-CD4-PE, onde resultou numa gate no dot plot de tamanho e granularidade, que definam a população de linfócitos de acordo com suas características morfológicas, e a partir da mesma avaliando-se a intensidade de fluorescência de FITC vs. PE.

No citômetro as células foram suspensas numa solução fisiológica e injetadas em um sistema de fluídos para serem expostas individualmente a um feixe de luz (laser) direcionado ao meio líquido em fluxo. Cada partícula que passa através do feixe dispersa a luz de uma maneira. A dispersão analisada pelos detectores sensíveis à dispersão frontal "Forward Scatter" (FSC) e lateral "Side Scatter" (SSC) da luz, apresentam informações sobre a estrutura física e química de cada partícula. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas. Permite a análise de vários parâmetros simultaneamente como por exemplo: volume celular (tamanho); granulosidade celular; antígenos à superfície celular (marcadores CD).

### Análise Estatística

Para as análises das citocinas foram utilizados os testes não paramétricos de descritivos e comparativos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. A hipótese de nulidade foi rejeitada quando a possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedia 5% (p<0,05).

Os dados obtidos através da imunofenotipagem foram analisados através de diversas estratégias, dependendo do fenótipo celular rastreado. Assim, empregando-se os recursos múltiplos do programa CELLQuest™, adotando diferentes estratégias para essas avaliações, baseadas em propostas disponíveis na literatura vigente<sup>10</sup>. Quando necessário, as análises fenotípicas foram realizadas com auxílio do software FlowJoo.

## RESULTADOS

Um total de 9 atletas de futsal feminino foram caracterizadas neste estudo apresentando idade média de 24 anos. Colheu amostras de sangue em dois momentos do campeonato esportivo: (a) antes do início de treinamento esportivo

(campeonato esportivo) e (b) após o treinamento (finalizando o campeonato esportivo, aproximadamente, após 60 dias em relação a primeira coleta). Para o grupo controle pareado em termos de etnia e idade colheu somente uma amostra de sangue,

considerando o perfil sedentário não praticante de atividade física. O Quadro 1 sumaria as características étnicas e idade nos grupos estudados selecionados para este estudo.

**Quadro - 1:** Caracterização do grupo controle (indivíduos saudáveis/sedentários, n=9) e atletas de futsal (n=9).

	<b>Controle</b>	<b>Idade</b>	<b>Grupo étnico</b>
1	LON	29	B
2	RL	22	N
3	JTS	21	B
4	PTO	19	B
5	OIL	27	P
6	MIR	25	P
7	DRC	20	B
8	GH	20	B
9	ER	19	B
	<b>Atleta Futsal</b>	<b>Idade</b>	<b>Grupo étnico</b>
1	ANJ	19	B
2	ADF	22	N
3	OLD	21	B
4	ACE	19	B
5	SDR	20	P
6	TYU	25	P
7	GH	21	B
8	DC	20	B
9	DFR	20	B

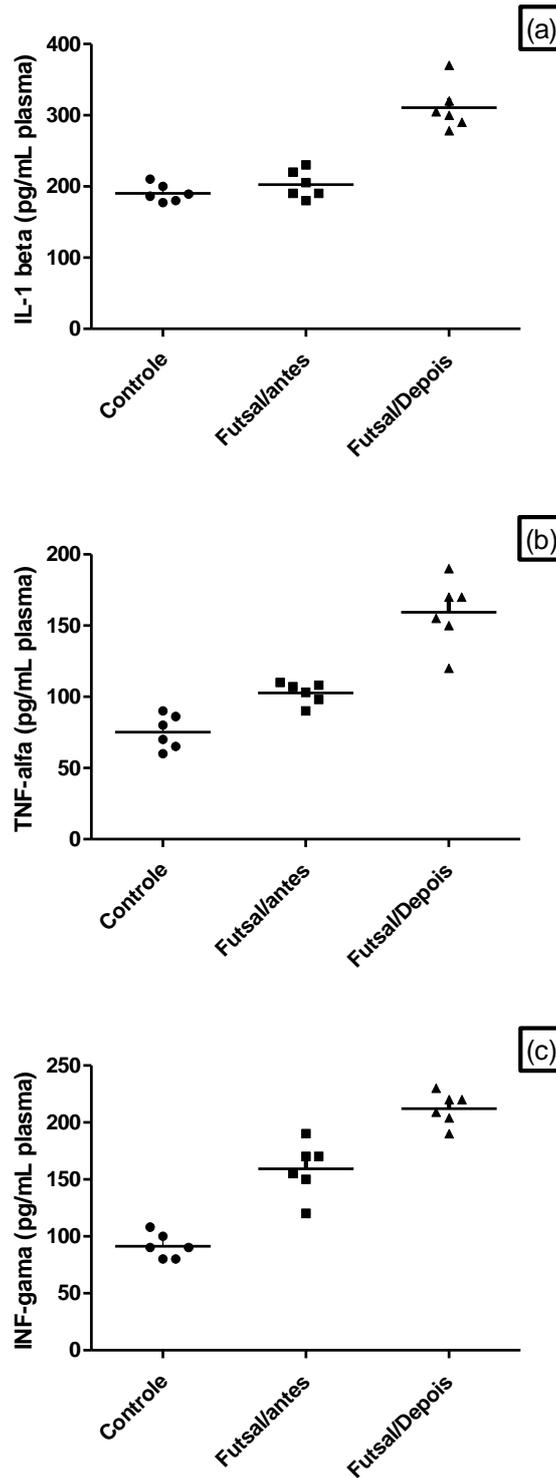
Grupo étnico: B - branco, N - negro, P - pardo.

Para cada parâmetro estudado, foi realizada uma análise descritiva em que os valores amostrais são expressos sob as formas de mediana e valor de p em comparação aos grupos dos das atletas e controles, uma vez que, em todas as análises estatísticas aqui realizadas foram utilizados testes não-paramétricos.

A Figura 1 (a e b) mostra os valores das dosagens de citocinas com perfil pró-inflamatório da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , no plasma do grupo controle e atletas de futsal. Os resultados identificam aumento dessas citocinas no plasma das atletas no final do campeonato quando comparados com os indivíduos controle ( $p < 0,0001$  para cada comparação). Tal resultado provavelmente esteja associado ao perfil celular leucocitário modificado pelas atletas durante a intensa atividade física. Também temos que considerar que no final do campeonato as atletas de alguma forma apresentam lesão celular favorecendo o recrutamento de

células fagocíticas que são estimuladoras para a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Os níveis aumentados de IFN- $\gamma$  observado nas atletas antes e após o campeonato (Figura 1c) sugere-se que a atividade física pode contribuir com a estimulação de resposta imunoregulatória e atividade celular do SI.

A Figura 2 ilustra os resultados encontrados na fenotipagem linfocitária CD4+ (Figura 2a) e CD8+ (Figura 2b) no sangue periférico no grupo controle e as atletas de futsal. Os dados mostram aumento da expressão desses perfis celulares dos linfócitos T helper e citotóxico nas atletas em relação ao grupo controle. Interessantemente, após o campeonato, conota-se uma expressão maior de CD4+ nas atletas; tal fato pode ser justificado pela ativação do sistema imune no que se refere o papel importante desta célula na produção de citocinas conforme ilustrado na Figura 1 ( $p < 0,001$  para cada comparação).

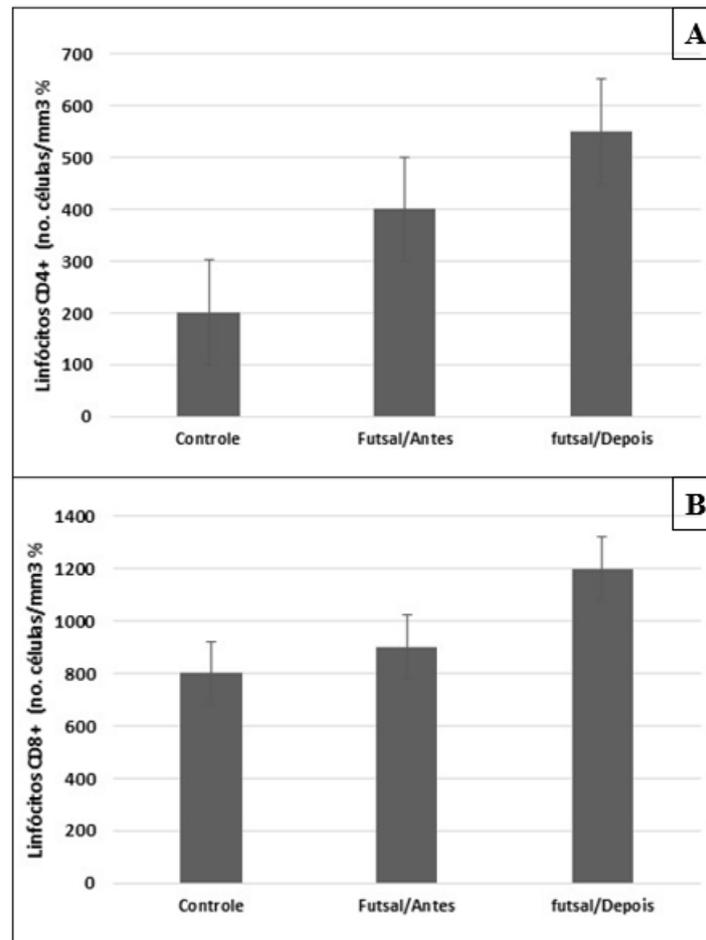


**Figura - 1.** Determinação da atividade das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  (a) e TNF- $\alpha$  (b) e anti-inflamatória (IFN- $\gamma$  (c)) no plasma de indivíduos normais e em atletas de futsal antes e após o campeonato esportivo. Os resultados foram expressos em pg/mL de plasma. As quantificações foram avaliadas através de ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos específicos.

### DISCUSSÃO

O exercício físico provoca alterações funcionais no sistema imunológico, melhorando ou reduzindo a função imune dependendo da frequência, duração e intensidade na qual é

realizado<sup>11,12</sup>. Estudos vêm demonstrando que o exercício físico moderado (<60% do VO<sub>2</sub> máximo) está relacionado ao aumento da resposta dos mecanismos de defesa orgânica, enquanto que o exercício físico mais intenso e prolongado (>65% do VO<sub>2</sub> máximo) a diminui, assim como o sistema de reparo<sup>13,14</sup>.



**Figura 2** - Fenotipagem linfocitária T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B) no sangue periférico das atletas de futsal antes e após o campeonato esportivo e grupo controle, expressos em porcentagem de células. As análises foram avaliadas através de citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais específicos. Valores apresentados em médias + erro padrão.

Ainda, o exercício físico apresenta capacidade de controlar ativação de células do sistema imune como neutrófilos, macrófagos e linfócitos<sup>1</sup>.

A considerar a complexidade do sistema imune envolvendo células e moléculas, encontramos um exemplo comum de marcador inflamatório definido como as citocinas, proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos de células (incluindo linfócitos T) e que agem de maneira autócrina, parácrina e endócrina. Essas moléculas são frequentemente associadas a propagação da resposta imunológica. Sua atividade biológica ocorre a partir da ligação a receptores específicos nas células-alvos, desencadeando vias de transdução de sinal que estimulam expressão gênica<sup>15</sup>.

De acordo com Ferreira et al. (2009)<sup>17</sup> a atividade física pode induzir uma resposta inflamatória, através de aumentos nos níveis séricos de IL-1, TNF- $\alpha$  e da citocina responsiva IL-6, seguido pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, TGF- $\beta$ , IL-1ra, sTNF-r2 que são inibidores das citocinas pró-inflamatórias. Deste modo, o tipo, duração e intensidade do exercício são fatores primordiais para o perfil da resposta das citocinas pós exercício. Um exemplo disto é a liberação de IL-1 que parece ser mais sensível à intensidade do exercício, enquanto TNF- $\alpha$  e IL-6 são mais sensíveis a duração do exercício.

O exercício regular oferece proteção contra a mortalidade por todas as causas, principalmente pela proteção contra a aterosclerose, diabetes tipo 2, câncer de cólon e câncer de mama<sup>18,19</sup>. Além disso, o treinamento físico é eficaz no tratamento de pacientes com doença isquêmica do coração<sup>20</sup>, insuficiência cardíaca<sup>21</sup>, diabetes tipo 2<sup>21</sup> e doença pulmonar obstrutiva crônica<sup>22</sup>. O exercício físico reduz os riscos de doenças coronárias por melhorar marcadores inflamatórios. Petersen, Pedersen

(2005)<sup>18</sup> mostram que o exercício pode ajudar a mobilizar células do sistema imune, aumentando os níveis circulatórios de citocinas anti-inflamatórias com capacidade inibitórias de citocinas pró-inflamatórias.

Diferentes estudos têm sugerido a atividade física regular pode oferecer proteção contra doenças cardiovasculares e a quadros diabéticos. O tecido adiposo contribui para a produção de TNF- $\alpha$ , considerado fator importante para resistência à insulina e dislipidemia e que IL-6 é um marcador da síndrome metabólica. Durante o exercício, IL-6 é produzido por fibras musculares através de estímulo de TNF-independente além de permitir em nível plasmático a distribuição de mediadores anti-inflamatórias a IL-10. Além disso, IL-6 inibe a produção de citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$ , estimulando lipólise, bem como a oxidação de gordura. Nós sugerimos que o exercício regular induz a supressão de TNF- $\alpha$  e oferece desse modo a proteção de encontro à resistência de insulina. Recentemente, IL-6 foi introduzido como o primeiro myokine, definido como uma citocina que é produzida e liberada pela contração de fibras musculares esqueléticas, exercendo seus efeitos em outros órgãos do corpo. Aqui sugerimos que myokines pode estar envolvido na mediação dos efeitos benéficos para a saúde do exercício e que estes, em particular, estão envolvidos na proteção contra doenças crônicas associadas com a inflamação de baixa qualidade, como diabetes e doenças cardiovasculares. A obesidade é caracterizada por um estado pró-inflamatório, que desempenha um papel na patogênese da doença metabólica e cardiovascular. Uma sessão de exercício causa um aumento transitório de citocinas pró-inflamatórias, enquanto o treinamento tem efeitos anti-inflamatórios. Em resposta ao exercício prolongado em indivíduos obesos e sobrepesos apresentaram aumento dos níveis

de IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8 sendo que a IL-6 permaneceu significativamente por período de tempo maior<sup>18,23</sup>.

O IFN- $\gamma$  é um potente ativador de macrófagos, estimula a produção de NO e radicais de oxigênio, favorece o aumento da expressão de moléculas do MHC (classe I e II), moléculas de adesão, moléculas co-estimuladoras (B7 e CD40) e receptores para a região Fc de anticorpos IgG (Fc $\gamma$ R) na superfície de células apresentadoras de antígeno<sup>6-8</sup>. Os linfócitos TCD8+ são também grandes secretores de IFN- $\gamma$ <sup>18</sup>. Deste modo, nossos dados vêm corroborar com as funções atribuídas a essa citocina, incluindo que o IFN- $\gamma$  além de estar sendo estimulado pela células T CD8+ que derão aumentadas, também podem estar facilitando a expressão de moléculas que são capazes de ampliar a ativação das células linfocitárias.

Mesmo não tendo quantificado o cortisol neste estudo, considera-se importante ressaltar sua função mediante ao SI e correlacionarmos com os dados encontrados. O cortisol é um glicocorticoide importante para a manutenção da homeostasia corpórea. Ele atua aumentando o catabolismo proteico no músculo, reduzindo a síntese de proteínas, levando aminoácidos ao fígado para a gliconeogênese, aumenta a lipólise, fornecendo glicerol ao fígado, e reduzindo o uso da glicose pelos tecidos e a sensibilidade à insulina. Além de produzir efeitos catabólicos, o cortisol ainda tem efeito anti-inflamatório, pois reduz a síntese de lipocortina inibindo a produção de interleucina-2 (IL-2), diminuindo assim a produção de linfócitos T, histaminas e serotonina; como consequência, há supressão da resposta imune. Ainda, o cortisol atua modulando os sinais que estimulam o início do processo inflamatório, dentre eles modifica a ativação de leucócitos através de contato com fragmentos celulares e outras substâncias como histamina, bradicinina e enzimas proteolíticas. Esses sinais informam aos leucócitos que algo está errado e que células estão sofrendo lise. Uma das ações do cortisol é impedir a degradação dessas células através da estabilização das membranas dos lisossomos, dificultando sua ruptura e a consequente lise da célula. Se considerarmos que as atletas possam estar com níveis de cortisol modificados devido ao estresse, nossos resultados sugerem que o aumento de LT CD3+CD4+ e LT CD3+CD8+ podem ter sido favorecido pelo estímulo na produção de citocinas e não pela influência do cortisol, corroborando assim com a imunomodulação nas atletas praticantes de futsal, modalidade profissional.

Sumariando, este estudo sugere uma estimulação predominante do perfil linfocitário T helper associados a uma ativação imunológica na resposta adaptativa submetidos ao estímulo de citocinas.

## REFERÊNCIAS

1-Belotto, M. F. Efeito do exercício físico sobre o estado inflamatório de diabéticos. EFDeportes.com, Revista Digital. 2011; 16(159):1-5.

2-Weineck, J. *Biologia do Esporte*. 7ª ed, São Paulo: Manole, 2005.

3-Leandro C, Nascimento E, Manhães-de-Castro R, Duarte JA, Castro, CMMB. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos de integrações. *Rev Port Ciências do Desporto*. 2002; 2(5): 80-90.

4- Lima AMJ. Correlação entre as medidas direta e indireta do VO<sub>2</sub>max em atletas de futsal. *Rev Bras Med Esporte*. 2005; 11(3):159-161.

5-Guyton AC, Hall, JE. *Tratado de fisiologia médica*. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

6- Dellalibera-Joviliano R, Dos Reis ML, Cunha Fde Q, Donadi EA. Kinins and cytokines in plasma and cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *J Rheumatol*. 2003;30(3):485-92.

7-Bestetti RB, Dellalibera-Joviliano R, Lopes GS, Faria-Jr M, Furlan-Daniel R, Lopes KC, Batista DR. Determination of the Th1, Th2, Th17, and Treg cytokine profile in patients with chronic Chagas heart disease and systemic arterial hypertension. *Heart Vessels*. 2019; 34(1):123-133.

8- Dellalibera-Joviliano R, Joviliano EE, Silva JS, Evora PR. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(1):28-35.

9-Souza MCP, Lourenço FRF, Dellalibera-Joviliano R. Imunodulação em modelo experimental de artrite reumatóide submetido ao tratamento de complexo de paládio e natação. *Rev Bras Prescrição e Fisiologia do Exercício*. 2017; 11(67):439-446.

10-Sathler-Avelar R, Lemos EM, Martins-Filho OA. Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes During Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*. 2003; 58: 655-663.

11-Meyer T, Gabriel HH, Ratz M, Muller HJ, Kindermann W. Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:549-555.

12-Nieman DC. Exercise, infection, and immunity. *Int J Sports Med*. 1994; 15:131-141.

13-Cannon JG. Exercise and resistance to infection. *J Appl Physiol*. 1993; 74:973-981.

14-Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW, Arabatzis K. Infections episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness*. 1990;30:316-328.

15- Tonet AC, Nobrega OT. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol*. 2008; 11 (2):259-273.

16- Rahman A, Tiwari A, Narula J, Hickling T. Importance of feedback and feedforward loops to adaptive immune response modeling. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol. 2018; 7(10):621-628.

17-Ferreira FC, de Medeiros AI, Nicioli C, Nunes JE, Shiguemoto GE, Prestes J, Verzola RM, Baldissera V, Perez SE. Circuit resistance training in sedentary women: body composition and serum cytokine levels. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2010;35(2):163-71.

18- Petersen AMW, Pedersen, BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98: 1154-1162, 2005.

19- Blair SN, Cheng Y, and Holder JS. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? *Med Sci Sports Exerc* 33: S379-S399, 2001.

20- Jolliffe JA, Rees K, Taylor RS, Thompson D, Oldridge N, and Ebrahim S. Exercise-based rehabilitation for coronary heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD001800, 2000.

21-Boule NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, and Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA* 286: 1218 –1227, 2001

22-Lacasse Y, Brosseau L, Milne S, Martin S, Wong E, Guyatt GH, and Goldstein RS. Pulmonary rehabilitation for chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD003793, 2002.

23- Verheggen RJHM, Eijsvogels TMH, Catoire M, Terink R, Ramakers R, Bongers CCWG, Mensink M, Hermus ARMM, Thijssen DHJ, Hopman MTE. Cytokine responses to repeated, prolonged walking in lean versus overweight/obese individuals. *J Sci Med Sport*. 2019 Feb;22(2):196-200.