
EXERCISE INDUCED ALTERATIONS IN RAT MONOCYTE NUMBER, MORPHOLOGY, AND FUNCTION

MARCIA G. GUERESCHI^{†1}, JONATO PRESTES^{‡2,1}, FELIPE F. DONATTO^{#1}, RODRIGO DIAS^{#1}, ANELENA B. FROLLINI^{#1}, CLÍLTON KO. FERREIRA^{#1}, CLAUDIA R. CAVAGLIERI^{#1}, ADRIANNE C. PALANCH^{#1}

¹Health Sciences Faculty, Methodist University of Piracicaba, São Paulo, BRAZIL;

²Physiological Sciences Department, Exercise Physiology Laboratory, Federal University of São Carlos, São Paulo, BRAZIL

[†]Denotes graduate student author, [‡]denotes professional author

ABSTRACT

Int J Exerc Sci 1(2) : 71-78, 2008. The purpose of this study was to verify the histophysiological alterations in monocytes and macrophages induced by short periods of exercise. Male Wistar rats (age = 2 months, body weight = 200g) were divided into seven groups (N = 6 each): sedentary control (C), groups exercised (swimming) at low intensity for 5 (5L), 10 (10L), and 15 minutes (15L), and groups exercised at moderate intensity for 5 (5M), 10 (10M) or 15 minutes (15M). At moderate intensity the animals carried a load of 5% of body weight on their backs. Blood monocytes were evaluated for quantity and morphology, and peritoneal macrophages were analyzed for quantity and phagocytic activity. Data were analyzed using ANOVA and Tukey's post hoc test ($p \leq 0.05$). Low intensity groups and 5M exhibited an increase in monocyte levels when compared with the control. There was an increase in monocyte cellular area for the 5L, 10L, 5M and 10M groups; monocyte nuclear area increased for the 10L, 5M and 10M groups in comparison with the control. There was an increase in peritoneal macrophages for the 15L, 10M, 15M and decrease for the 5M group. Macrophage phagocytic capacity increased for low intensity groups and for 10M group. The exercise performed for short periods modulated macrophage levels and function, and monocyte levels and morphology, in an intensity-dependent manner. The sum of acute responses observed in this study may exert a protective effect against sickness and may be used to improve health and lifespan.

KEY WORDS: Exercise, cells morphometry, innate immune system, phagocytosis

INTRODUCTION

The present day lack of time, excessive work journeys and stress have led individuals to perform short bouts of exercise (5–25 minutes). Exercise intensity, duration and frequency, and individual levels of physical fitness are important factors in determining immune response to physical effort (14). Exercise may stimulate

or lower immune function. Macrophages and monocytes are part of the innate immune system and are quickly activated when there is an infection. Macrophages phagocytize microorganisms, kill some and present them as antigens to lymphocytes. Immunosuppression of these functions potentially exposes the organism to antigens, which may result in complex diseases (1). Regular exercise performed at

moderate intensity is commonly associated with increased immune resistance against infections (12). On the other hand, strenuous exercise has been associated with transitory immune suppression, potentially increasing susceptibility to infections (14), especially upper respiratory infections. (6, 7).

Glucocorticoids and catecholamines are released during exercise and stimulate leukocyte chemotaxis, adhesion, phagocytosis and antigens presentation (22, 8, 21). Thyroid, prolactin, growth hormone (GH) and endorphins contribute to exercise-induced stress on phagocytosis (17). Stress hormones, especially glucocorticoids, released during strenuous exercise are immunosuppressive for lymphocytes. In this situation, phagocytosis and other innate immune mechanisms are stimulated and could compensate suppressed lymphocyte activity (17). Exhaustive exercise has been shown to enhance or suppress certain functions of macrophages; it appears that the modulatory effect of exercise on the monocytes and macrophages is dependent on the parameter being measured, source of tissue macrophages, and the intensity and duration of exercise (22). However, very little information exists with regard to the effect of brief periods of acute exercise on monocyte and macrophage function. It was expected that even a short duration exercise (five to fifteen minutes) would increase monocyte number; macrophage function and morphology due to the immunomodulatory stress imposed by an acute session.

Understanding of the role exercise plays in the immune system function is important to

enable one to know whether or not to recommend exercise for people with depressed or dysfunctional immune systems. An animal model was used, because it is a more homogeneous population and external variables are more easily controlled. The aim of the study was to investigate the effect of acute exercise performed at low and moderate intensities on the histophysiology of rat macrophages and monocytes.

METHOD

Animals

All experiments were conducted in accordance with the policy of the American College of Sports Medicine on Research with Experimental Animals and was approved by the Federal University of São Carlos Experimental Animals Committee. Two-month-old male Wistar rats (*Rattus norvegicus var. albinus*, Rodentia, Mammalia) with a mean weight of 190-210g were used. Animals had free access to water and were fed a commercial chow for rodents (Labina, Purina, Campinas, SP, Brazil). The animals were maintained in collective cages (5 rats per cage) at a constant temperature of 23(± 2)°C, and a cycle of 12 hours light/12 hours dark, with light from 06:00h to 18:00h (the housing was pathogen-free). Before the beginning of the experiments, the animals underwent 48 hours of adaptation to the laboratory conditions.

Experimental groups

Animals were divided into seven groups (N = 6 each group): a sedentary control group; groups exercised at low intensity for 5 (5L), 10 (10L), or 15 minutes (15L), and groups exercised at moderate intensity for 5 (5M),

EXERCISE AND MONOCYTES

10 (10M), or 15 minutes (15M). The exercised groups performed a single acute exercise session.

Physical Exercise

The physical exercise chosen was swimming, accomplished between 14.00h and 17.00h in a tank maintained at 30(±2)°C. The groups exercised at low intensity did not carry additional loads. At moderate intensity the animals carried a load of 5% of body weight on their backs, which corresponds to intensity below the inflection point of the curve of the lactate threshold (9). The animals were sacrificed immediately after the end of the exercise and blood and macrophages were collected. Analyses were carried out after that, on the same day.

Total Circulating Levels of Leukocytes and Monocytes

Blood samples were collected and stored in glass tubes with EDTA and kept on ice for the analysis of blood variables. The total leukocyte count was obtained with Türk's solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and counting was performed in a Neubauer chamber. The circulating levels of monocytes were measured under an optical microscope using a blood smear stained with Giemsa-May-Grünwald (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2). The blood counts were blinded, only one of the authors knew what the groups were and this author did not participate in the counting.

Total count and phagocytic capacity of peritoneal macrophages

Peritoneal cavity was washed with 10mL of PBS (pH 7.4 and 4°C) to remove resident

macrophages. Cells were counted in a Neubauer Chamber with Trypan Blue colorant (Sigma, St. Louis, MO, USA). A calculation was made to obtain a solution aliquot in 2.0×10^6 cells/mL dilutions. To this aliquot, the following components were added: 50µL of rat serum opsonized Zymosan (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100µL of glucose 56mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 200µL of defatted albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA), and PBS to complete 1mL. The solution was incubated at 37°C for 40 minutes with low shake, and 100 cells were analyzed under light microscope using Trypan Blue colorant. When three particles of Zymosan were phagocytized by the macrophage, the cell was considered to have increased phagocytic capacity (Figure 1) (19).

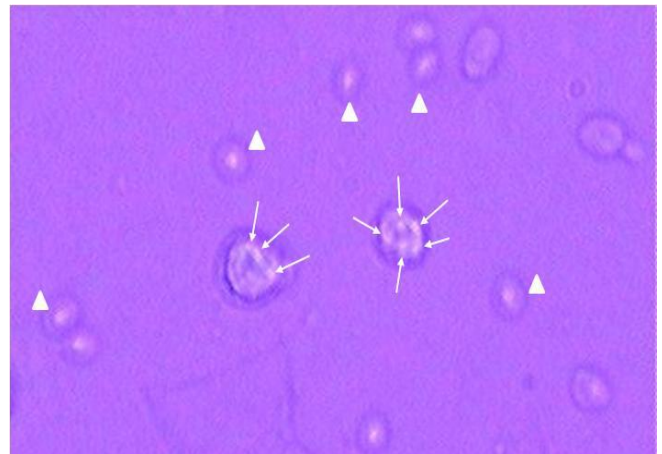


Figure 1. Photomicrography of peritoneal macrophage (M), total preparation stained with Trypan Blue. The dense structures observed in the cell cytoplasm are the phagocytized particles of Zymosan (arrow). Around these cells are several Zymosan particles indicated by the thick white arrows.

Morphometry analysis

Initially the blood smears were prepared in duplicate, followed by 2-3 minutes of drying. Thereafter, the staining was done

with 3ml of May-Grünwald and Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the analysis was conducted under a light microscope according to recommendation of Sokol et al. (20). From 20 monocytes taken from each animal, cellular and nuclear areas were obtained by applying an image analyzer system Image Pro Plus Version 4.0 for Windows.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). The normality of distribution of all parameters was checked with the Kolmogorov-Smirnov test. Differences were analyzed by using two-way analysis of variance (ANOVA) considering exercise duration and intensity as intervenient factors, followed by Tukey's *post hoc* test. A significance level of $p \leq 0.05$ was used for all comparisons (duration of exercise with control and between groups and intensity of exercise with control and between groups). The software package used was SPSS for Windows version 10.0.

RESULTS

A significant increase in total leukocytes was observed for the exercised groups when compared with the control group. An increase was observed for the 5M group in comparison the 5L (44%) group. An increase in circulating monocytes was observed for the groups exercised at low intensity and for 5M group, in comparison with the control. Lower monocyte values were evident for the 10M (60%) and 15M (45%) groups when compared with the 10L and 15L groups, respectively (Table 1).

A significant increase in peritoneal macrophages was observed for the 15L,

10M and 15M exercised groups of 26%, 22% and 48%, respectively; the 5M group presented decrease (23%) when compared with the control. In the comparison between groups, a decrease in peritoneal macrophages was observed for the 5M (25%); increase for the 10M (25%) and for the 15M (18%) groups when compared with the 5L, 10L and 15L groups, respectively (Table 1).

Table 1. Circulating levels of leukocytes, monocytes and peritoneal macrophages, and phagocytic capacity of macrophages for the control and groups exercised for 5, 10 and 15 minutes at low and moderate intensities.

Group	Circulating leukocytes	Circulating monocytes	Peritoneal macrophages	Phagocytosis (%)
C	4.12 \pm 0.17	1.53 \pm 0.3	14.08 \pm 0.57	74.8 \pm 0.74
5L	8.70 \pm 1.07*	5.03 \pm 0.71*	14.47 \pm 0.4	79.8 \pm 0.49*
10L	11.53 \pm 1.09*	7.36 \pm 0.91*	13.73 \pm 0.13	78.8 \pm 0.8*
15L	9.50 \pm 0.92*	6.35 \pm 0.6*	17.77 \pm 0.5*	83 \pm 0.45*
5M	12.56 \pm 0.9*#	5.24 \pm 0.3*	10.80 \pm 0.54*#	75 \pm 0.63#
10M	9.17 \pm 0.6*	2.90 \pm 0.24#	17.20 \pm 0.35*#	79.6 \pm 0.68*
15M	11.61 \pm 0.61*	3.45 \pm 0.69#	20.91 \pm 0.56*#	77.4 \pm 0.75#

Values are mean \pm SEM, cells are expressed $\times 10^6$. C, control group; 5L, 5 minutes low-intensity exercise, 10L, 10 minutes low-intensity exercise, 15L, 15 minutes low-intensity exercise, 5M, 5 minutes moderate-intensity exercise, 10M, 10 minutes moderate-intensity exercise, 15M, 15 minutes moderate-intensity exercise. *Significant difference when compared with the control group. #Significant difference between exercised groups for the same duration ($p \leq 0.05$).

The groups exercised at low intensity and the 10M group exhibited increased phagocytic capacity in peritoneal macrophages when compared with the control. A significant decrease in phagocytic capacity of peritoneal macrophages was observed for the 5M (6%) and for the 15M (7%) groups in comparison with the 5L and 15L groups (Table 1).

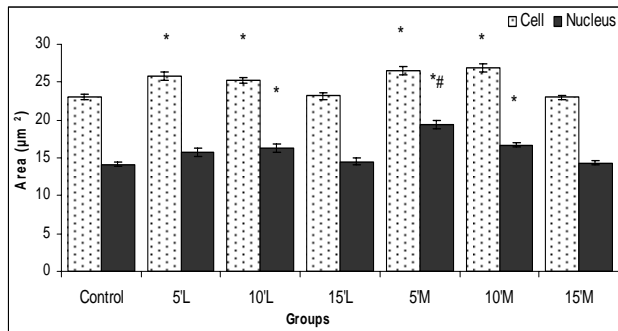


Figure 2. Cellular and nuclear morphometry of circulating monocytes. Values are expressed for area in μm^2 mean \pm SEM. C, control group; 5L, 5 minutes low-intensity exercise, 10L, 10 minutes low-intensity exercise, 15L, 15 minutes low-intensity exercise, 5M, 5 minutes moderate-intensity exercise, 10M, 10 minutes moderate-intensity exercise, 15M, 15 minutes moderate-intensity exercise. *Significant difference when compared with the control group; #Significant difference between exercised groups for the same duration, ($p \leq 0.05$).

The 5L, 10L, 5M, and 10M groups presented an increase in monocyte cellular area (12%, 9%, 15% and 19%, respectively) when compared with the control. A significant increase in monocyte nuclear area was observed for the 10L (15%), 5M (37%), and 10M (18%) groups in comparison with the control. The 5M group presented a significant increase in nuclear area (23%) in comparison with the 5L group (Figure 2).

DISCUSSION

In parallel with a general leukocytosis, the findings for low intensity exercise were mainly an increase of circulating monocytes and peritoneal macrophage phagocytosis seen for any duration of short-term exercise. On the other hand, for the moderate intensity short-term exercise, the main findings were an increase in the numbers of peritoneal macrophages for ten and fifteen minutes of exercise and an

increased phagocytosis for ten minutes of exercise. Concerning circulating monocytes a picture of a transient increase of nuclear and/or cellular morphometry was seen in the five and ten minutes exercises, disappearing in fifteen minutes exercise, irrespective of the intensity.

Leukocytosis is caused by contraction of the spleen and other secondary lymphatic organs, in addition to the modulation of increased plasma catecholamines on immune cell migration and activity. This mechanism induces an alteration in the interaction between cells and the endothelium promoting fast leukocyte demargination during exercise (11, 13). In the present study, a significant increase in total leukocytes was observed for the groups exercised at low and moderate intensities.

Moderate exercise increases the expression of adhesion molecules in monocytes and transendothelial migration induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) (21). However, exercise performed at high intensity promotes down-regulation in transendothelial migration (20). This mechanism is partially responsible for the increase observed in peritoneal macrophages for the groups 15L, 10M, and 15M. In this case, monocytes would be stimulated to migrate through the endothelium; the migration of these monocytes could culminate in infiltration into the peritoneum. Hence, the increase in thyroid hormones induced by exercise stimulates macrophage chemotaxis (16), and also low levels of noradrenalin modulate macrophage chemotaxis mediated by the β -adrenergic receptors (8). In addition, β -endorphin improves the

chemotaxis of monocytes and macrophages (10).

Monocytes located at the marginal pool produce TNF- α and other pro-inflammatory cytokines that coordinate innate and specific immune cell functions, including interactions with endothelial cells, differentiated expression of effective molecules on the cell surface, growth and differentiation (13). Additionally, these cells are quickly and selectively mobilized to the central circulation, as exercise induces an increase in catecholamines (18). In the present study, this increase in circulating monocytes was seen after exercise performed at low intensity and in 5 minutes of exercise performed at moderate intensity. Although catecholamine levels were not measured, the increase in this hormone is a classical alteration observed in the first few minutes of physical exercise. With 10 and 15 minutes of exercise at moderate intensity, circulating monocytes were not changed compared with the sedentary group, but monocyte values were lower as compared with the same duration low intensity groups. No previous studies have evaluated this exercise length and no mechanisms have thus far been proposed in the literature. However, a possible explanation may be a higher migration of circulating monocytes to peritoneal tissue. This may explain the observation in peritoneal monocytes, in which the 10 and 15 minute moderate intensity groups presented higher values in tissue than low intensity groups.

These are possible explanations for the increase in circulating monocytes observed in the present study and for the increase in the cellular and nuclear area of these

monocytes verified during the first 5 and 10 minutes of exercise, performed at low and moderate intensities. This response to exercise promotes selective mobilization in monocyte subsets from the marginal pool and may induce morphological alterations. However, with regard to morphological alterations, it is difficult to establish the exact mechanism responsible for the alterations observed and the studies are sparse.

It is important to mention that the present study has limitations, for example, only peritoneal tissue monocytes and macrophages were counted. For future investigations the activated monocytes and peritoneal macrophages should be measured with flow cytometry so that the changes induced by short duration exercise may bring more important clinical perspectives.

In humans, exercise performed at moderate intensity and for a duration of 3 hours will induce increases in IL-1 β , IL-6 and TNF- α plasma concentration; however, gene expression and mRNA of these proteins do not change in blood monocytes. It was suggested that activated intratissue cells, such as macrophages, could be responsible for the increase in systemic cytokines (13).

The secretion of these cytokines may contribute to the alteration in monocyte cellular and nuclear area. Exercise increases the plasma concentration of several substances: β -endorphins, glucocorticoids, catecholamines, prolactin, and thyroid hormones. Macrophages and monocytes have surface receptors for these molecules (17). In monocytes, the synthesis and expression of these receptors can be up-

regulated, as verified by the increase in adhesion molecules (21) and β -endorphin synthesis (3), mediated by exercise. Consequently, these factors promote alterations in monocyte cellular and nuclear area.

The increase in phagocytosis of tissue macrophages can be correlated with increased corticosterone levels after strenuous exercise (4, 5). Noradrenalin, in synergy with its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxyphenyl-glycol (HMPG), modulates the phagocytic process of macrophages mediated by the stimulation of α - and β -adrenoreceptors (8). The increase in prolactin plasma concentrations induced by exercise stimulates chemotaxis, phagocytosis, and microbicidal activity of phagocytes (15). The exercise protocols (intensity and duration) used by previous studies are potentially different from the exercise performed in the present study (short-term), although an increase in peritoneal macrophage phagocytic capacity was observed; the exact mechanism still needs to be addressed.

High concentrations of thyroid hormones and β -endorphins secreted during exercise also modulate chemotaxis and phagocytosis of macrophages (10, 5, 16).

The main findings of this study were the morphological and functional alterations in monocytes, through the increase in cellular and nuclear area and an increase in phagocytic capacity after short periods of exercise. There is a paucity of studies that have analyzed the acute immune responses to 5, 10 and 15 minutes of exercise. The alteration in immune cell morphometry after exercise can bring new investigation

perspectives, indicating a research field to be explored in exercise immunology. Exercise performed for a short duration may stimulate monocyte function. However, the consequences of these acute alterations need to be investigated from a chronic perspective. The sum of acute responses observed in this study may exert a protective effect against sickness and may be used to improve health and lifespan (14). Based on the results of the present study, one may conclude that short-term, low and moderate intensity exercise may be interesting for starting a physical activity program for sedentary individuals, since no deleterious alterations were observed in monocyte function.

REFERENCES

1. Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H. Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 57: 421-31, 2002.
2. Dornfest BS, Lapin DM, Naughton BA, Adu S, Korn L, Gordon AS. Phenylhydrazine-induced leukocytosis in the rat. *J Leuk Biol* 39: 37-48, 1986.
3. Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 15: 218-224, 1994.
4. Forner MA, Barriga C, Rodriguez AB, Ortega E. A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis. *J Physiol* 1: 789-94, 1995.
5. Forner MA, Barriga C, Ortega E. Exercise-induced stimulation of murine macrophages phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J Appl Physiol* 80: 899-903, 1996.
6. Friman G, Ilbäck NG. Acute infection: Metabolic responses, effects on performance, interaction with exercise, and myocarditis. *Int J Sports Med* 19: S172-S182, 1998.

EXERCISE AND MONOCYTES

7. Friman G, Wesslen L. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: infections and exercise in high-performance athletes. *Immunol Cell Biol* 78: 510-522, 2000.
8. Garcia JJ, Del Carmen Saez M, De La Fuente M, Ortega E. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxoxyphenyl-glycol. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors. *Mol Cell Biochem* 254: 299-304, 2003.
9. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LAS, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Bioch Physiol* 130: 21-27, 2001.
10. Ichinose M, Asai M, Sawada M. β -endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* 42: 311-316, 1995.
11. Infante JR, Peran F, Martinez M, Poyatos R, Roldan A, Ruiz C. Lymphocyte sub-populations and catecholamines; daytime variations and relationships. *Rev Esp Fisiol* 52: 143-148, 1996.
12. Matthews CE, Ockene IS, Freedson PS, Rosal MC, Merriam PA, Hebert JR. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc* 34: 1242-1248, 2002.
13. Moldoveanu AI, Shepard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL1 beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 89: 1499-504, 2000.
14. Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med* 27: 73-80, 1999.
15. Ortega E, Rodrigues MJ, Barriga C, Forner MA. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *Int J Sports Med* 17: 149-155, 1996.
16. Ortega E, Forner MA, Garcia JJ, Rodriguez AB, Barriga C. Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem* 201: 41-7, 1999.
17. Ortega E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev* 9: 70-93, 2003.
18. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534, 1989.
19. Serrano MAR, Curi R, Parry-Billings M, Willians JF, Newsholme EA. Effects of glucocorticoids on lymphocytes metabolism. *Am J Physiol* 264: E24-E28, 1993.
20. Sokol RJ, Hudson G, Wales J, James NT. Ultrastructural morphometry of human leucocytes in health and disease. *Electron Microsc Rev.* 4:179-195, 1991.
21. Wang JS, Chen YW, Chow SE, Ou HC, Sheu WH. Exercise paradoxically modulates oxidized low density lipoprotein-induced adhesion molecules expression and trans-endothelial migration of monocyte in men. *Thromb Haemost* 94: 846-52, 2005.
22. Woods JA. Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *Int J Sports Med* 21: S24-S30, 2000.

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO NO NÚMERO, FUNÇÃO E MORFOLOGIA DE MONÓCITOS DE RATOS

MARCIA G. GUERESCHI^{†1}, JONATO PRESTES^{‡2,1}, FELIPE F. DONATTO^{†1}, RODRIGO DIAS^{†1}, ANELENA B. FROLLINI^{†1}, CLÍLTON KO. FERREIRA^{†1}, CLAUDIA R. CAVAGLIERI^{†1}, ADRIANNE C. PALANCH^{†1}

¹Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, São Paulo, BRASIL; ²Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia do Exercício, Federal Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, BRASIL

[†]Denota autor aluno de graduação, [‡]denota autor profissional

RESUMO

Int J Exerc Sci 1(2): 71-78, 2008. O propósito desse estudo foi verificar as alterações histofisiológicas em monócitos e macrófagos induzidas por curtos períodos de exercícios. Ratos Wistar (idade = 2 meses, peso corporal = 200g) foram divididos em sete grupos (n=6 cada): controle sedentário (C), grupos exercitados (natação) na intensidade leve por 5 (5L), 10 (10L) e 15 minutos (15L), e grupos exercitados em intensidade moderada por 5 (5M), 10 (10M) e 15 minutos (15M). Na intensidade moderada os animais carregaram uma carga de 5% do peso corporal dos mesmos em seus respectivos dorsos. Os monócitos sanguíneos foram avaliados quanto à quantidade e morfologia e os macrófagos peritoneais foram analisados quanto à quantidade e atividade fagocitária. Os dados foram analisados usando ANOVA e Tukey's *post hoc* test ($p \leq 0,05$). Os grupos de intensidade leve e 5M apresentaram aumento nos níveis dos monócitos quando comparados com o controle. Foi observado aumento na área celular dos monócitos para os grupos 5L, 10L, 5M e 10M; a área nuclear aumentou para os grupos 10L, 5M e 10M em comparação com o controle. Houve aumento nos macrófagos peritoneais para os grupos 15L, 10M, 15M e diminuição no grupo 5M. A capacidade fagocitária dos macrófagos aumentou nos grupos de intensidade leve e para o grupo 10M. O exercício realizado por curtos períodos modulou o número e função dos macrófagos, assim como o número e morfologia dos monócitos, sendo tais alterações dependentes da intensidade. A soma das respostas agudas observadas nesse estudo pode exercer um efeito protetor contra doenças, podendo ser utilizada para a melhora da saúde e qualidade de vida.

KEY WORDS: Exercício, morfometria celular, sistema imune inato, fagocitose

INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a carência de tempo, jornada de trabalho excessiva e estresse têm levado os indivíduos a realizar sessões curtas de exercícios (5–25 minutos). A intensidade, duração e frequência do

exercício, assim como níveis individuais de aptidão física, são importantes fatores na determinação da resposta imune em relação ao esforço físico (14). O exercício pode estimular ou reduzir a função imune. Macrófagos e monócitos são componentes importantes do sistema imune inato sendo

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

rapidamente ativados frente a uma infecção. Macrófagos fagocitam microorganismos, eliminando alguns destes e apresentam os antígenos aos linfócitos. A imunossupressão dessas funções potencialmente expõe o organismo aos antígenos, resultando em complexas doenças (1). O exercício regular realizado em intensidade moderada está associado com aumento da resistência imune contra infecções (12). Por outro lado, o exercício extenuante, tem sido associado com transitória supressão imune, potencialmente aumentando a susceptibilidade às infecções (14), especialmente infecções das vias respiratórias superiores (6, 7).

Glicocorticóides e catecolaminas são liberadas durante o exercício e estimulam a quimiotaxia, adesão, fagocitose e apresentação dos antígenos pelos leucócitos (22, 8, 21). A prolactina, hormônios tireoidianos, hormônio do crescimento (GH) e endorfinas contribuem para a fagocitose, frente ao estresse induzido pelo exercício (17). Os hormônios do estresse, especialmente os glicocorticóides, liberados durante o exercício exaustivo são imunossupressores para os linfócitos. Frente a essa situação, a fagocitose e outros mecanismos da imunidade inata, são estimulados e podem compensar a supressão da atividade linfocitária (17). O exercício exaustivo tem mostrado melhorar ou suprimir certas funções dos macrófagos; parece que o efeito modulatório do exercício nos monócitos e macrófagos é dependente dos parâmetros que são avaliados, origem dos macrófagos teciduais, assim como intensidade e duração do exercício (22). Contudo, as informações existentes com respeito a

breves períodos de exercícios agudos sobre os monócitos e função dos macrófagos são escassas. Foi hipotetizado que um exercício de curta duração (cinco a quinze minutos) poderia aumentar o número dos monócitos; função e morfologia dos macrófagos em decorrência do estresse imunomodulatório imposto por uma sessão aguda de exercício.

O entendimento do papel que o exercício desempenha nas funções do sistema imune é importante para capacitar os profissionais da fisiologia do exercício na recomendação ou não do exercício para indivíduos com disfunção ou depressão do sistema imune. Foi utilizado um modelo animal devido a este ser uma população mais homogênea e as variáveis externas serem mais facilmente controladas. O objetivo do estudo foi investigar o efeito do exercício agudo, realizado em intensidade leve e moderada sobre a histofisiologia de macrófagos e monócitos de ratos.

MÉTODOS

Animais

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte para o Trabalho com Animais Experimentais e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos. Foram usados ratos Wistar com dois meses de idade (*Rattus norvegicus* var. albinus, Rodentia, Mammalia) com peso médio de 190-210g. Os animais tiveram livre acesso a água e ração comercial para roedores (Labina, Purina, Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos por gaiola) a uma temperatura constante de 23(± 2)°C e ciclo claro/escuro

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

de 12 horas, com luz das 06:00h às 18:00h (os animais estavam livres de patógenos). Antes de iniciar os experimentos, os animais passaram por 48 horas de adaptação as condições do laboratório.

Grupos experimentais

Os animais foram divididos em sete grupos (N = 6 cada grupo): um grupo controle sedentário (C); grupos exercitados na intensidade leve por 5 (5L), 10 (10L) e 15 minutos (15L), e grupos exercitados na intensidade moderada por 5 (5M), 10 (10M) e 15 minutos (15M). Os grupos exercitados realizaram apenas uma sessão de exercício agudo.

Exercício físico

O exercício físico escolhido foi a natação, realizada entre 14.00h e 17.00h em um tanque mantido a temperatura de 30(±2)°C. Os grupos exercitados em intensidade leve não transportaram cargas adicionais. Na intensidade moderada os animais transportaram uma carga correspondente a 5% do peso corporal dos mesmos em seus respectivos dorsos, correspondendo a uma intensidade abaixo do ponto de inflexão da curva do limiar do lactato (9). Os animais foram sacrificados imediatamente após o final do exercício e o sangue e macrófagos foram coletados. As análises foram realizadas após este procedimento, no mesmo dia.

Concentração circulante total de leucócitos e monócitos

Amostras sanguíneas foram coletadas em tubos com EDTA e armazenadas no freezer para análise das variáveis sanguíneas. O número total de leucócitos foi obtido com solução de TURKEY (Merck KGaA,

Darmstadt, Germany) e a contagem foi realizada na câmara de Neubauer. A concentração circulante de monócitos foi mensurada através do microscópio óptico utilizando esfregaço sanguíneo corado com Giemsa-May-Grünwald (Sigma, St. Louis, MO, USA) (2).

Contagem total e capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais

A cavidade peritoneal foi lavada com 10mL de PBS (pH 7,4 e 4°C) para remover macrófagos residentes. As células foram contadas na Câmara de Neubauer com o corante Triplan Blue (Sigma, St. Louis, MO, USA). Um cálculo foi utilizado para obter uma alíquota da solução em diluições de $2,0 \times 10^6$ células/mL. A esta alíquota, os seguintes componentes foram adicionados: 50µL de Zymosan sérico de ratos opsonizado (Sigma, St. Louis, MO, USA), 100µL de glicose 56mM (Sigma, St. Louis, MO, USA), 200µL de albumina (Sigma, St. Louis, MO, USA), e PBS para completar 1mL. A solução foi incubada a 37°C durante 40 minutos com agitação leve, e 100 células foram analisadas em microscopia de luz usando colorante Trypan Blue. Quando três partículas de Zymosan eram fagocitadas pelo macrófago, a célula era considerada com capacidade fagocitária aumentada (Figura 1) (19).

Análise morfométrica

Os monócitos sanguíneos foram analisados por microscopia de luz usando esfregaço sanguíneo corado com May-Grünwald e Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, USA). A partir de 20 monócitos retirados de cada animal, as áreas celulares e nucleares foram obtidas por meio da aplicação de um sistema de análise de imagens Pro Plus Version 4.0 para Windows.

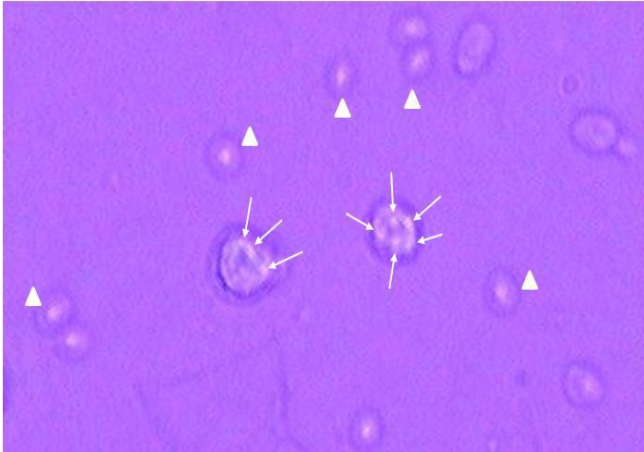


Figure 1. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais (M), preparação total corada com Trypan Blue. As estruturas densas observadas nos citoplasmas das células são partículas fagocitadas de Zymosan (seta). Ao redor destas células estão várias partículas de Zymosan indicadas pelas setas brancas grossas.

Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média). A normalidade e distribuição de todos os parâmetros foram conferidas com o teste Kolmogorov-Smirnov. As diferenças foram analisadas por meio da análise de variância two-way (ANOVA) considerando como fatores intervenientes a duração e intensidade do exercício seguido pelo teste de Tukey post hoc. Um nível de significância de $p \leq 0,05$ foi usado em todas as comparações (duração do exercício com o controle e entre grupos e intensidade do exercício com o controle e entre os grupos). O software utilizado foi o SPSS, plataforma Windows, versão 10.0.

RESULTADOS

Foi observado aumento significativo nos leucócitos totais para os grupos exercitados quando comparados com o grupo controle; aumento nos leucócitos totais no grupo 5M em comparação ao grupo 5L (44%). Foi

observado aumento nos monócitos circulantes para os grupos exercitados em intensidade leve e para o grupo 5M, em comparação com o controle. Houve diminuição nos monócitos nos grupos 10M (60%) e 15M (45%) quando comparados respectivamente, com os grupos 10L e 15L (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração circulante de leucócitos, monócitos e macrófagos peritoneais, e capacidade fagocitária de macrófagos para os grupos controle e grupos exercitados por 5, 10 e 15 minutos nas intensidades leve e moderada.

Grupo	Total			
	leucócitos circulantes x 10 ⁶	Total monócitos circulantes x 10 ⁶	Total macrófagos peritoneais x 10 ⁶	Fagocitose (%)
C	4,12 \pm 0,17	1,53 \pm 0,3	14,08 \pm 0,57	74,8 \pm 0,74
5L	8,70 \pm 1,07*	5,03 \pm 0,71*	14,47 \pm 0,4	79,8 \pm 0,49*
10L	11,53 \pm 1,09*	7,36 \pm 0,91*	13,73 \pm 0,13	78,8 \pm 0,8*
15L	9,50 \pm 0,92*	6,35 \pm 0,6*	17,77 \pm 0,5*	83 \pm 0,45*
5M	12,56 \pm 0,9*#	5,24 \pm 0,3*	10,80 \pm 0,54*#	75 \pm 0,63#
10M	9,17 \pm 0,6*	2,90 \pm 0,24#	17,20 \pm 0,35*#	79,6 \pm 0,68*
15M	11,61 \pm 0,61*	3,45 \pm 0,69#	20,91 \pm 0,56*#	77,4 \pm 0,75#

Valores são média \pm EPM. C, grupo controle; 5L, 5 minutos de exercício na intensidade leve; 10L, 10 minutos de exercício na intensidade leve; 15L, 15 minutos de exercício na intensidade leve; 5M, 5 minutos de exercício na intensidade moderada; 10M, 10 minutos de exercício na intensidade moderada; 15M, 15 minutos de exercício na intensidade moderada. *Diferença significativa quando comparado com o grupo controle. #Diferença significativa entre grupos exercitados na mesma duração ($p \leq 0,05$).

Houve aumento significativo nos macrófagos peritoneais para os grupos exercitados 15L, 10M e 15M, respectivamente de 26%, 22% e 48%; o grupo 5M apresentou diminuição (23%) quando comparado com o controle. Na comparação entre os grupos, uma diminuição nos macrófagos peritoneais foi observada para o grupo 5M (25%); aumento para os grupos 10M (25%) e 15M (18%)

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

quando comparados respectivamente, com os grupos 5L, 10L e 15L (Tabela 1).

Os grupos exercitados na intensidade leve e grupo 10M apresentaram aumento na capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais quando comparados com o grupo controle. Uma diminuição na capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais foi observada para os grupos 5M (6%) e 15M (7%) em comparação respectivamente, com os grupos 5L e 15L (Tabela 1).

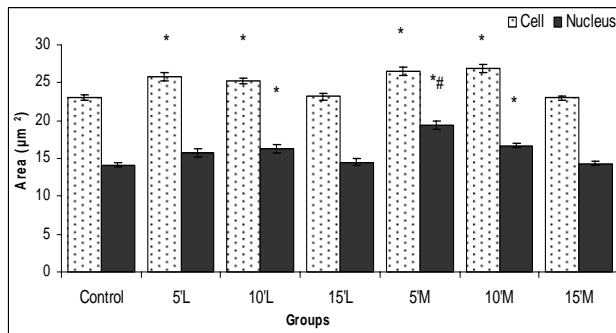


Figura 2. Morfometria celular e nuclear dos monócitos circulantes. Valores são expressos por área em μm^2 média \pm EPM. C, grupo controle; 5L, 5 minutos de exercício na intensidade leve; 10L, 10 minutos de exercício na intensidade leve; 15L, 15 minutos de exercício na intensidade leve; 5M, 5 minutos de exercício na intensidade moderada; 10M, 10 minutos de exercício na intensidade moderada; 15M, 15 minutos de exercício na intensidade moderada. *Diferença significativa quando comparado com o grupo controle. #Diferença significativa entre grupos exercitados na mesma duração ($p \leq 0,05$).

Os grupos 5L, 10L, 5M e 10M apresentaram um aumento na área celular dos monócitos (12%, 9%, 15% e 19%, respectivamente) quando comparados com o controle. Foi observado aumento significativo na área nuclear dos monócitos para os grupos 10L (15%), 5M (37%) e 10M (18%) em comparação com o controle. O grupo 5M

apresentou aumento na área nuclear (23%) em comparação com o grupo 5L (Figura 2).

DISCUSSÃO

Em paralelo com a comum leucocitose, os achados para o exercício de intensidade leve foram: principalmente um aumento nos monócitos circulantes e fagocitose de macrófagos peritoneais observados para qualquer duração frente às sessões de exercícios de curtos períodos. Por outro lado, para os exercícios de curta duração na intensidade moderada, o principal achado foi o aumento no número de macrófagos peritoneais para dez e quinze minutos e uma aumentada fagocitose para dez minutos de exercício. Com relação aos monócitos circulantes um quadro de aumento agudo no núcleo e /ou morfometria celular foi observado nas sessões de exercícios de cinco e dez minutos, desaparecendo em 15 minutos de exercício, independente da intensidade do mesmo.

A leucocitose é provocada pela contração do baço e outros órgãos linfáticos secundários, em adição a modulação do aumento das catecolaminas plasmáticas na migração e atividade das células imunes. Esse mecanismo induz uma alteração na interação entre as células e o endotélio, promovendo uma rápida desmarginação dos leucócitos durante o exercício (11, 13). No presente estudo, um significativo aumento nos leucócitos totais foi observado nos grupos exercitados na intensidade leve e moderada.

O exercício moderado aumenta a expressão das moléculas de adesão nos monócitos e induz uma migração trans-endotelial

induzida pela lipoproteína de baixa densidade oxidada (ox-LDL) (21). Contudo, o exercício realizado em alta intensidade promove uma regulação negativa na migração trans-endotelial (20). Esse mecanismo, parcialmente pode ser responsável pelo aumento observado nos macrófagos peritoneais nos grupos 15L, 10M e 15M. Nesse caso, os monócitos poderiam ser estimulados para migrar através do endotélio; a migração desses monócitos pode culminar na infiltração para dentro do peritônio. Conseqüentemente, o aumento nos hormônios tireoidianos induzido pelo exercício, estimula a quimiotaxia dos macrófagos (16) e também baixos níveis de noradrenalina modulam a quimiotaxia dos macrófagos mediado pelos receptores β -adrenérgicos (8). Em adição, a β -endorfina melhora a quimiotaxia dos monócitos e macrófagos (10).

Os monócitos situados no pool marginal produzem TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias que coordenam as funções celulares imunes específicas e inatas, incluindo interações com as células endoteliais, expressão diferenciada de moléculas efetoras sobre a superfície celular, crescimento e diferenciação (13). Adicionalmente, essas células são rapidamente e seletivamente mobilizadas para a circulação central, à medida que o exercício induz aumentos nas catecolaminas (18). No presente estudo, esse aumento nos monócitos circulantes foi observado depois do exercício realizado na intensidade leve e em 5 minutos de exercício realizado na intensidade moderada. Embora os níveis de catecolaminas não tenham sido medidos, o aumento nesses hormônios é uma alteração

clássica observada nos primeiros minutos de exercício físico. Com 10 e 15 minutos de exercício em intensidade moderada, os monócitos circulantes não se alteraram comparado com o grupo controle sedentário, mas os valores dos monócitos estavam reduzidos comparados com o grupo de mesma duração na intensidade leve. Nenhum estudo prévio avaliou essa duração de exercício e nenhum mecanismo foi proposto na literatura. Contudo, uma possível explicação pode ser uma alta migração dos monócitos circulantes para o tecido peritoneal. Isso pode explicar as observações quanto aos monócitos peritoneais, nos quais, os grupos 10 e 15 minutos em intensidade moderada apresentaram valores teciduais mais elevados em comparação com os grupos de intensidade leve.

Essas são possíveis explicações para o aumento nos monócitos circulantes observadas no presente estudo e para o aumento na área celular e nuclear nesses monócitos verificada durante os primeiros 5 e 10 minutos de exercício, realizado na intensidade leve e moderada. Essa resposta ao exercício promove uma seletiva mobilização dos monócitos do pool marginal e podem induzir alterações morfológicas. Contudo, com relação às alterações morfológicas, é difícil estabelecer o exato mecanismo responsável pelas alterações observadas e os estudos são escassos.

É importante mencionar que o presente estudo apresenta limitações, por exemplo, somente os monócitos e macrófagos teciduais peritoneais foram contados. Para futuras investigações, os monócitos ativados e macrófagos peritoneais

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

poderiam ser medidos através da técnica de citômetro de fluxo, de tal modo que, as alterações induzidas por exercícios de curta duração podem trazer mais importantes perspectivas clínicas.

Em humanos, o exercício realizado na intensidade moderada e por uma duração de 3 horas induzirá aumento na concentração plasmática de IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; Contudo, a expressão gênica e RNAm dessas proteínas não se alteraram nos monócitos do sangue. Dessa forma, foi sugerido que células intra-teciduals ativadas, assim como macrófagos, poderiam ser as responsáveis pelo aumento nas citocinas sistêmicas (13).

A secreção dessas citocinas pode contribuir para a alteração na área celular e nuclear dos monócitos. O exercício aumenta a concentração plasmática de várias substâncias: β -endorfinas, glicocorticóides, catecolaminas, prolactina e hormônios tireoidianos. Macrófagos e monócitos apresentam receptores de superfícies para essas moléculas (17). Nos monócitos, a síntese e expressão desses receptores podem ser reguladas positivamente, como verificado pelo aumento nas moléculas de adesão (21) e síntese de β -endorfina (3), mediada pelo exercício. Conseqüentemente, esses fatores promovem alterações na área celular e nuclear dos monócitos.

O aumento na fagocitose dos macrófagos teciduais pode ser correlacionado com aumentos nos níveis de corticosterona depois do exercício extenuante (4, 5). A noradrenalina, em sinergia com o seu metabólito final 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (HMFG), modulam o processo fagocitário dos macrófagos mediado pela

estimulação dos adrenoreceptores α e β (8). O aumento nas concentrações plasmáticas de prolactina induzido pelo exercício estimula a quimiotaxia, fagocitose e atividade microbicida dos fagócitos (15). Os protocolos de exercícios (intensidade e duração) utilizados nos estudos acima são potencialmente diferentes do exercício realizado no presente estudo (curtos períodos), embora um aumento na capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais tenha sido observado; o exato mecanismo ainda precisa ser demonstrado.

Altas concentrações de hormônios tireoidianos e β -endorfinas, secretados durante o exercício também modulam a quimiotaxia e fagocitose dos macrófagos (10, 5, 16).

Os principais achados do presente estudo foram às alterações morfológicas e funcionais nos monócitos, por intermédio do aumento na área celular e nuclear e um aumento na capacidade fagocitária depois de curtos períodos de exercício. Existe uma escassez de estudos que avaliaram essas respostas agudas após 5, 10 e 15 minutos de exercício. A alteração na morfometria celular depois do exercício agudo pode trazer novas perspectivas de investigações, indicando um campo de pesquisa para ser explorado dentro da imunologia do exercício. O exercício realizado com curta duração pode estimular a função dos monócitos. Porém, as conseqüências dessas alterações agudas precisam ser investigadas sobre uma perspectiva crônica. A soma dessas respostas agudas observadas nesse estudo pode exercer um efeito protetor contra doenças, podendo ser utilizadas para melhorar da saúde e qualidade de vida (14). Baseados nos resultados do presente

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

estudo, pode-se concluir que o exercício de curta duração, de intensidade leve e moderada pode ser interessante para iniciar um programa de atividade física para indivíduos sedentários, já que nenhuma alteração deletéria foi observada na função dos monócitos.

REFERENCES

1. Djaldetti M, Salman H, Bergman M, Djaldetti R, Bessler H. Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors. *Microsc Res Tech* 57: 421-31, 2002.
2. Dornfest BS, Lapin DM, Naughton BA, Adu S, Korn L, Gordon AS. Phenylhydrazine-induced leukocytosis in the rat. *J Leuk Biol* 39: 37-48, 1986.
3. Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 15: 218-224, 1994.
4. Forner MA, Barriga C, Rodriguez AB, Ortega E. A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis. *J Physiol* 1: 789-94, 1995.
5. Forner MA, Barriga C, Ortega E. Exercise-induced stimulation of murine macrophages phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J Appl Physiol* 80: 899-903, 1996.
6. Friman G, Ilbäck NG. Acute infection: Metabolic responses, effects on performance, interaction with exercise, and myocarditis. *Int J Sports Med* 19: S172-S182, 1998.
7. Friman G, Wesslen L. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: infections and exercise in high-performance athletes. *Immunol Cell Biol* 78: 510-522, 2000.
8. Garcia JJ, Del Carmen Saez M, De La Fuente M, Ortega E. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxiphyenyl-glycol. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors. *Mol Cell Biochem* 254: 299-304, 2003.
9. Gobatto CA, Mello MAR, Sibuya CY, Azevedo JRM, Santos LAS, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Bioch Physiol* 130: 21-27, 2001.
10. Ichinose M, Asai M, Sawada M. β -endorphin enhances phagocytosis of latex particles in mouse peritoneal macrophages. *Scand J Immunol* 42: 311-316, 1995.
11. Infante JR, Peran F, Martinez M, Poyatos R, Roldan A, Ruiz C. Lymphocyte sub-populations and catecholamines; daytime variations and relationships. *Rev Esp Fisiol* 52: 143-148, 1996.
12. Matthews CE, Ockene IS, Freedson PS, Rosal MC, Merriam PA, Hebert JR. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc* 34: 1242-1248, 2002.
13. Moldoveanu AI, Shepard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL1 beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* 89: 1499-504, 2000.
14. Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med* 27: 73-80, 1999.
15. Ortega E, Rodrigues MJ, Barriga C, Forner MA. Corticosterone, prolactin and thyroid hormones as hormonal mediators of the stimulated phagocytic capacity of peritoneal macrophages after high-intensity exercise. *Int J Sports Med* 17: 149-155, 1996.
16. Ortega E, Forner MA, Garcia JJ, Rodriguez AB, Barriga C. Enhanced chemotaxis of macrophages by strenuous exercise in trained mice: thyroid hormones as possible mediators. *Mol Cell Biochem* 201: 41-7, 1999.
17. Ortega E. Neuroendocrine mediators in the modulation of phagocytosis by exercise: physiological implications. *Exerc Immunol Rev* 9: 70-93, 2003.
18. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74: 2527-2534, 1989.
19. Serrano MAR, Curi R, Parry-Billings M, Willians JF, Newsholme EA. Effects of glucocorticoids on

EXERCÍCIO E MONÓCITOS

lymphocytes metabolism. *Am J Physiol* 264: E24-E28, 1993.

20. Sokol RJ, Hudson G, Wales J, James NT. Ultrastructural morphometry of human leucocytes in health and disease. *Electron Microsc Rev.* 4:179-195, 1991.

21. Wang JS, Chen YW, Chow SE, Ou HC, Sheu WH. Exercise paradoxically modulates oxidized low density lipoprotein-induced adhesion molecules expression and trans-endothelial migration of monocyte in men. *Thromb Haemost* 94: 846-52, 2005.

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