

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**GUILHERME BORGES PEREIRA**

**Efeitos agudos do exercício resistido sobre marcadores da resposta  
inflamatória e imune**

**SÃO CARLOS**  
**2012**

**GUILHERME BORGES PEREIRA**

**Efeitos agudos do exercício resistido sobre marcadores da resposta  
inflamatória e imune**

**Tese apresentada ao Programa  
Interinstitucional de Pós-Graduação em  
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal  
de São Carlos para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências Fisiológicas.**

**Área de Concentração:  
Ciências Fisiológicas**

**Orientador: Prof. Dr. Sergio Eduardo de  
Andrade Perez**

**SÃO CARLOS**

**2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P436ea

Pereira, Guilherme Borges.

Efeitos agudos do exercício resistido sobre marcadores da resposta inflamatória e imune / Guilherme Borges Pereira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

88 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Imunologia. 2. Exercícios físicos. 3. Linfócitos. 4. Apoptose. 5. Migração. I. Título.

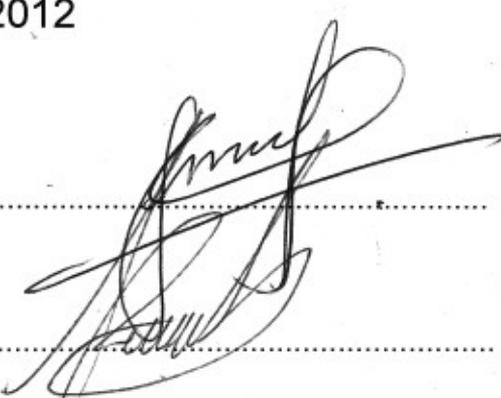
CDD: 616.079 (20<sup>a</sup>)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas  
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Guilherme Borges Pereira

Dia 11/12/2012

Prof. Dr. Sergio Eduardo de Andrade Perez.....

Prof. Dr. Reury Frank Pereira Bacurau.....

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Regina Cavaglieri.....

Prof. Dr. Herbert Gustavo Simões.....

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Keico Okino Nonaka.....

A minha mãe, que nunca mediu esforços na educação dos seus filhos.

## AGRADECIMENTOS

“Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos em Deus.” Nada na vida acontece por um acaso, e se aconteceu, Deus quis assim. Muito obrigado!

À minha família,

Sempre me lembro da minha mãe dizendo:

“Meu filho, cuidado com o mundo! Vai e segue o seu caminho!”

Foi o que fiz. Segui meu caminho, e muitas vezes me esqueci de vocês, só lembrei de mim...

Hoje, quando olho para trás, tenho a certeza de que só cheguei até aqui, porque vocês, meus pais (Nívia e Donizeti) e meus irmãos (Juliana, Natália e Gabriel), acreditaram e estiveram sempre comigo!

Ao Prof. Dr. Sérgio E. A. Perez, por ter aberto as portas do laboratório, confiado no meu trabalho, e o mais importante, por ter se tornado um grande amigo para todas as horas.

Ao Prof. Dr. Jonato Prestes, por fazer parte de toda a minha formação, ter criado a maioria das minhas oportunidades profissionais, ter sido um excelente professor na minha formação científica, ser amigo, companheiro, um verdadeiro irmão. Meu irmão, estamos juntos pra sempre!

Ao Rodrigo e ao Richard, pela sincera e incondicional amizade. Vocês me ajudaram a escrever um dos capítulos mais bonitos da minha vida. Sei que posso contar com vocês em qualquer momento!

Aos amigos de república por onde passei. Nunca me esqueci desse ambiente acolhedor, familiar e inspirador proporcionado por cada um de vocês (Guilherme Speretta e Clariana, Julian Venâncio, Paulo Bossini, Danilo Conti, Amilton Vieira, Anderson Lino, Markus Vinicius, Danilo Bertucci e José Neto).

Ao Prof. Dr. James Navalta, pelos ensinamentos, virtudes e os valores transmitidos desde o dia em que o conheci. Mais que um professor, um pessoa do bem, um verdadeiro amigo!

Ao Ramires Tibana, um dos pilares mais importantes no desenvolvimento dos manuscritos apresentados no corpo dessa tese de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional.

À Secretaria de Pós-Graduação do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em especial ao Alexandre e a Carmen, pelo carinho, atenção e profissionalismo dispensados durante minha passagem pelo programa.

À Secretaria do Laboratório de Fisiologia do Exercício, a secretária Márcia, por toda amizade e profissionalismo durante a minha passagem pelo laboratório.

Aos companheiros de mestrado e doutorado, Markus Vinicius, Luciane Magri, Gustavo Canevazzi, Fabiano Ferreira, Marina Rodrigues, Mateus Domingos e Maria Fernanda por todas as experiências acadêmicas e amizade compartilhadas.

À todos os monitores do laboratório de Fisiologia do Exercício - UFSCar, pela amizade, experiências e momentos fisiológicos compartilhados.

Ao *Department of Kinesiology, Recreation, and Sport* da *Western Kentucky University*, por facilitar a parceria e disponibilizar infra-estrutura e equipamentos para o desenvolvimento do projeto de pesquisa dessa tese de doutorado.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite em participar da defesa, e principalmente, pela relevante contribuição acadêmica e científica.

“Se vi ao longe é porque estava nos ombros dos gigantes.”

**Aristóteles.**

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>MANUSCRITO I</b>	<b>17</b>
<b>RESPOSTAS AGUDAS AO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR PARA A APOPTOSE E MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+</b>	<b>17</b>
RESUMO	18
ABSTRACT	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS	23
ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	30
REFERÊNCIAS	<b>35</b>
<b>MANUSCRITO II</b>	<b>41</b>
<b>EFEITOS AGUDOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A OSTEOPROTEGERINA E CITOCINAS EM MULHERES COM SÍNDROME METABÓLICA</b>	<b>41</b>
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAIS E MÉTODOS	46
ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	59
REFERÊNCIAS	63
<b>APÊNDICE A - e-mail e o artigo científico aceito para publicação no periódico <i>cellular Immunology</i></b>	<b>71</b>
<b>APÊNDICE B - e-mail e o artigo científico II aceito para publicação no periódico <i>Clinical Physiology and Functional Imaging</i></b>	<b>79</b>

## APRESENTAÇÃO

Olhe para aquele Trem, a que lugar ele nos levará?

Acredito que a vida possa ser comparada a uma viagem de Trem, cheia de embarques e desembarques, agradáveis surpresas em muitos embarques e grandes tristezas em alguns desembarques. Embarcamos nesse trem quando nascemos e nos deparamos com algumas pessoas que julgamos que estarão sempre nessa viagem conosco.

A minha mãe, a maquinista inicial do trem, foi a responsável por demonstrar, incentivar e permitir que nos estudos eu pudesse me encontrar. E foi assim, desde criança fascinado com o conhecimento e com a ciência das mais diferentes áreas. Acabei me apaixonando pelo corpo humano e o seu funcionamento!

Com o objetivo de começar a ser maquinista desse Trem, o trem da vida, desembarquei em Patrocínio – MG (2002-2005), onde tive a felicidade de receber a formação profissional em Fisioterapia. É hora de partir, última chamada do trem! Um novo destino estava traçado em minha rota, Estação São Carlos – SP.

Na estação São Carlos, iniciei o Curso de pós-graduação *latu sensu* em Fisiologia do Exercício (2006-2007) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Em uma das primeiras aulas, o prof. Dr. Sérgio Eduardo de Andrade Perez comunicou a abertura do processo seletivo para monitoria no Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. Com esse comunicado, meu coração se encheu de alegria e esperança, pois sentia que esse laboratório era o meu lugar.

Preenchi e entreguei todos os documentos necessários para o processo seletivo, contei os dias para o resultado, até que veio a primeira surpresa: não fui classificado! E agora, o que vou fazer? Com o coração apertado e morrendo de medo, procurei o prof. Dr. Vilmar Baldissera na aula seguinte, o qual me ouviu em poucos segundos, mas de coração aberto, o meu sincero pedido: “Professor, eu preciso desta oportunidade de monitoria, é isso que eu quero para a minha vida!”. O prof. Vilmar com toda atenção disse que precisava conversar com o Prof. Sérgio para analisarem o meu pedido. Passados algumas semanas, fui informado que eu era o mais “novo monitor do Laboratório de Fisiologia do Exercício do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar”, que felicidade e reponsabilidade!

Como monitor do Laboratório de Fisiologia do Exercício, esbocei os primeiros passos científicos, sempre amparado por pessoas, companheiros e professores incríveis dispostos a ensinar. Assim, os primeiros traços da minha formação científica foram ganhando forma, e eu cada vez mais apaixonado pela fisiologia científica. No início de 2007, recebi a confirmação do prof. Dr. Sérgio do recebimento do aval para participar do processo seletivo de mestrado no Departamento de Ciências Fisiológicas sob sua orientação. Muito deslumbrado, imediatamente iniciei os estudos e a preparação para a seleção. Foi um ano de muita dedicação aos estudo, um ano de muita fisiologia! Parafraseando as sábias palavras do Prof. Vimar: “A fisiologia é cativante, motivante e não se esquece nunca!”.

Em março de 2008 já estava matriculado no Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP no nível mestrado, e juntamente com outros pós-graduandos, elaboramos e executamos um projeto científico temático amplo, investigando as alterações induzidas pela menopausa e as respostas ao exercício físico em vários tecidos e sistemas. Deste projeto, concluímos três mestrados (Richard, Josiane e eu) e três doutorados (Jonato, Gilberto e João Paulo), totalizando sete publicações em periódicos indexados no período de 2009-2011. Alguns destes trabalhos me chamaram bastante atenção, especialmente os relacionados com a resposta imune e inflamatória:

PRESTES, J. et al. Effects of resistance training on resistin, leptin, cytokines, and muscle force in elderly post-menopausal women. **Journal of Sports Sciences** (Print), v. 27, p. 1607-1615, 2009.

LEITE, R. D. et al. Menopause: Highlighting the Effects of Resistance Training. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, p. 761-767, 2010.

Em março de 2010, concluímos o mestrado com o artigo referente a dissertação aceito para publicação. Consequentemente, a matrícula para a pós-graduação nível doutorado foi realizada em abril de 2010. Neste ano, cursei as disciplinas disponíveis e começamos a rascunhar o projeto de pesquisa do doutorado. Durante nossos estudos e conversas no laboratório, perguntas e mais perguntas nos inquietavam em relação à resposta inflamatória e imunológica ao

exercício físico. Atingimos maturidade científica para definição do tema do projeto de doutorado durante o II Encontro Internacional em Fisiologia do Exercício – UFSCar, em maio de 2011, ao conhecer e conversar com o incrível Professor Dr. James Navalta. O Professor Dr. James Navalta foi um dos palestrantes do evento, discorrendo sobre a resposta Imunológica à Atividade Física, o qual consolidou nosso interesse em investigar as respostas imunológicas e inflamatórias ao exercício físico. Em julho de 2011, as conversas com o Professor Dr. James Navalta avançaram e surgiu a possibilidade de realizar o projeto de pesquisa nos Estados Unidos da América. E assim, no dia 24 de agosto de 2011, embarcamos (Jonato, Ramires e eu) com destino ao *Department of Kinesiology, Recreation, and Sport da Western Kentucky University (WKU)*, onde permanecemos durante quatro meses de muito trabalho e de aprendizado pessoal e técnico-científico.

Durante o período na WKU estudamos, elaboramos e executamos um projeto de pesquisa amplo, que permitisse a coleta de dados para elaboração de artigos científicos referente ao Pós-Doutorado do prof. Dr. Jonato Prestes, o mestrado do prof. Ramires e o meu doutorado. Neste projeto, investigamos os efeitos agudos do exercício resistido na resposta inflamatória e marcadores celulares da apoptose, migração e ativação de linfócitos T. Deste projeto, originou-se o primeiro resumo apresentado no *APS Intersociety Meeting: Integrative Biology of Exercise* pelo Prof. Dr. Sérgio E. A. Perez e o manuscrito dessa tese que apresento no formato de artigo aceito para publicação dia 2 de novembro de 2012 no *Cellular Immunology*:

1. PEREIRA, G. B. et al. Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4+ and CD8+ lymphocytes. **Cellular Immunology**, 2013. No prelo. (Apêndice A)

Convivendo, aprendendo com a cultura americana e os ensinamentos científicos do Prof. Dr. James Navalta, elaboramos e submetemos à periódicos indexados em conjunto com outros parceiros científicos os seguintes artigos:

NAVALTA, J. et al. Effectiveness of Blended Instruction utilizing On-Line Lectures and Split Classes in delivering in an Applied Exercise Physiology Course. **Medical Physiology Online**, v. 1, p. 1-7, 2012.

NAVARRO, F. et al. Moderate Exercise Increases the Metabolism and Immune Function of Lymphocytes in Rats. **European Journal of Applied Physiology** (Print), 2013.

TIBANA, R. A. et al. Acute Effects of Resistance Exercise On 24-Hour Blood Pressure In Middle-Aged Overweight And Obese Women. **International Journal of Sports Medicine**, 2012.

Acredito (acreditamos) que as parcerias científicas, entre laboratórios nacionais e/ou internacionais, possa ser um dos caminhos mais importantes para aumentar a produção, a qualidade científica e os laços pessoais entre os pesquisadores, permitindo assim contribuir para o desenvolvimento técnico-científico do Brasil. Com este pensamento e muitas parcerias em nosso histórico, projetos de pesquisa mais amplos e metodologicamente adequados puderam ser elaborados e desenvolvidos. Além da parceria com o Prof. Dr. James Navalta e a WKU, devo destacar a parceria com os professores Dr. Jonato Preses, Prof. Ramires Tibana e Prof. Dr. Otávio Nóbrega da Universidade Católica de Brasília. Nesta parceria investigamos os efeitos agudos do exercício resistido sobre as citocinas pró- e anti-inflamatórias em mulheres com Síndrome Metabólica, a qual permitiu a elaboração do segundo resumo apresentado no *17th Annual Congress of the European College of Sport Science* pelo Prof. Dr. Sérgio E. A. Perez e manuscrito dessa tese que apresento na forma de artigo científico, publicado *online* dia 17 de outubro de 2012 no periódico *Clinical Physiology and Functional Imaging*:

2. PEREIRA, G. B. et al. Acute Effects of Resistance Training on Cytokines and Osteoprotegerin in Women with Metabolic Syndrome. **Clinical Physiology and Functional Imaging** (Print), 2012. No prelo. (Apêndice B).

Como podemos observar, na estação São Carlos, encontrei mais do que professores e companheiros de especialização, mestrado e doutorado e parcerias, encontrei verdadeiros amigos. Encontrei uma segunda família!

Aqui aprendi muito mais do que precisava graças a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para me tornar uma pessoa e um profissional melhor. O

importante é que não estou sozinho, pois eu sei que em São Carlos, no Departamento de Ciências Fisiológicas, Laboratório de Fisiologia do Exercício, eu tenho uma família!

Chegou a hora de partir, o Trem está novamente em sua última chamada! O período na estação São Carlos está gravado no meu coração e DNA por toda a minha viagem. Ainda não sei qual é a próxima e a quais estações ele me levará. O importante é que vou sentir saudades e guardar boas recordações da Estação São Carlos no Trem da vida. Permito-me prestar uma singela homenagem e um sincero obrigado a todos vocês:

*“Mande notícias do mundo de lá  
Diz quem fica  
Me dê um abraço, venha me apertar  
Tô chegando*

*Coisa que gosto é poder partir  
Sem ter planos  
Melhor ainda é poder voltar  
Quando quero*

*Todos os dias é um vai-e-vem  
A vida se repete na estação  
Tem gente que chega pra ficar  
Tem gente que vai pra nunca mais*

*Tem gente que vem e quer voltar  
Tem gente que vai e quer ficar  
Tem gente que veio só olhar  
Tem gente a sorrir e a chorar  
E assim, chegar e partir*

*São só dois lados  
Da mesma viagem*

*O trem que chega  
É o mesmo trem da partida*

*A hora do encontro  
É também de despedida  
A plataforma dessa estação  
É a vida desse meu lugar  
É a vida desse meu lugar  
É a vida”*

Milton Nascimento, encontros e despedidas.

**MANUSCRITO I**

## MANUSCRITO I

### **RESPOSTAS AGUDAS AO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR PARA A APOPTOSE E MIGRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+**

Guilherme Borges Pereira<sup>1</sup>, Jonato Prestes<sup>2</sup>, Ramires Alsamir Tibana<sup>2</sup>, Gilberto Eiji Shiguemoto<sup>1</sup>, James Navalta<sup>3</sup>, Sergio Eduardo de Andrade Perez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Católica de Brasília. Brasília, Brasil.

<sup>3</sup> Department of Kinesiology and Nutrition Sciences of the University of Nevada. Las Vegas, Nevada, United States of America.

## RESUMO

O objetivo dos pesquisadores do presente estudo foi examinar os efeitos agudos do Exercício Resistido (ER) sobre a apoptose (Anexina V+) e a migração (CX<sub>3</sub>CR1) de linfócitos T CD4+ e CD8+. 12 sujeitos adultos realizaram duas sessões de ER (3 séries em 9 exercícios) com 1 minuto (Hiper-1) e 3 minutos (Hiper-3) de intervalo entre as séries e exercícios. Não foi observada alteração significativa na contagem celular de linfócitos CD4+ e CD8+ após os protocolos Hiper-1 e Hiper-3 ( $p > 0,05$ ). Foi observado aumento no percentual de linfócitos T CD4+ positivos para anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1 imediatamente após e 24 horas após Hiper-1 ( $p < 0,05$ ). A porcentagem de linfócitos T CD4+ positivos para anexina V+ aumentou 2 e 24 horas após Hiper-3 e diminuiu para CX<sub>3</sub>CR1 nos mesmos momentos ( $p < 0,05$ ). Houve aumento nos linfócitos T CD8+ positivos para anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1+ imediatamente e 24 horas após os protocolos Hiper-1 e Hiper-3 ( $p < 0,05$ ), enquanto que não foram observadas diferenças significativas entre Hiper-1 e Hiper-3 ( $p > 0,05$ ). O ER aumenta marcadores celulares de apoptose e migração em linfócitos T CD4+ e CD8+ mesmo 24 horas após uma sessão aguda de exercício, com mínimo efeito da duração do intervalo de descanso entre as séries e exercícios.

**Palavras-chave:** sistema imune; morte celular programada; leucócitos; migração celular; linfócitos B; linfócitos T.

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine the acute effects of resistance training (RT) on CD4+ and CD8+ T lymphocytes apoptosis (annexin V+) and migration (CX<sub>3</sub>CR1). Twelve subjects performed two RT sessions (3 sets of 9 exercises) with 1 min (Hyper-1) and 3 min (Hyper-3) of rest-interval length between sets and exercises. CD4+ and CD8+ cells count displayed no change following Hyper-1 and Hyper-3 ( $p > 0.05$ ). There was an increase in the percentage of CD4+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ immediately after and 24 h post Hyper-1 ( $p < 0.05$ ). Percentage of CD4+ positive for annexin V+ increased 2 and 24 h post Hyper-3, and decreased after CX<sub>3</sub>CR1+ for the same time-points ( $p < 0.05$ ). There was an increase in CD8+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ immediately after, 2 and 24 h post Hyper-1 and Hyper-3 ( $p < 0.05$ ), while no differences were found between Hyper-1 and Hyper-3 ( $p > 0.05$ ). Acute RT increase the apoptosis and migration of CD4+ and CD8+ lymphocytes even 24 h after exercise, with minimal effects of rest-interval length.

**Keywords:** immune system; programmed death cell; leukocytes; cell migration; lymphocytes T.

## INTRODUÇÃO

A resposta de diferentes células imunes ao exercício físico depende do tipo, intensidade e duração do exercício (Pedersen e Toft, 2000). Geralmente, os protocolos agudos proporcionam alterações bifásicas na contagem total de linfócitos no sangue. Nos primeiros minutos de exercício há uma rápida mobilização dos linfócitos para o sangue, resultando em uma elevada contagem sanguínea (linfocitose) (Pedersen e Toft, 2000). Especialmente os linfócitos com elevada capacidade citotóxica (por exemplo, células matadoras naturais – células NK e linfócitos CD8+) são altamente responsivos ao exercício físico quando comparado a outros sub-tipos de linfócitos (por exemplo, linfócitos CD4+ e B) que possuem limitada capacidade citotóxica e são mobilizados em pequeno número para o sangue. Durante os primeiros minutos pós-exercício, usualmente entre 30 minutos a 3 horas, a contagem sanguínea de linfócitos pode reduzir abaixo dos valores basais (linfocitopenia) com o retorno aos valores basais entre 6 e 24 horas após o exercício (Pedersen e Toft, 2000; Simpson, 2011). Acredita-se que parte desta redução linfocitária possa ser atribuída a eliminação por meio da morte celular programada (apoptose), movimentação das células da circulação para tecidos linfóides periféricos (migração) e/ou a combinação dos dois fatores (Navalta, Sedlock e Park, 2007; Navalta, Sedlock, Park *et al.*, 2007; Kruger, Agnischock *et al.*, 2011; Friedman, Navalta *et al.*, 2012).

Durante a recuperação de uma sessão de exercício físico, os linfócitos sanguíneos são expostos a uma grande quantidade de sinais pró-apoptóticos que incluem o aumento das concentrações sanguíneas de glicocorticóides, catecolaminas, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, os quais podem em conjunto promover alterações intracelulares nos linfócitos tornando-os mais susceptíveis a apoptose e migração (Pedersen e Toft, 2000; Simpson, 2011). Neste sentido, a Anexina V é membro da família de proteínas intracelulares anexina que possuem afinidade a fosfatidilserina cálcio-dependente. A fosfatidilserina é normalmente encontrada na região interna da membrana plasmática de células saudáveis, mas com o início da apoptose, a simetria da membrana plasmática é alterada e a fosfatidilserina se transloca para a região externa (Sekine, Moriyama *et*

*al.*, 2009; Grujic, Bartholdy *et al.*, 2010). Portanto, a Anexina V pode ser utilizada especificamente para identificar células em apoptose. Adicionalmente, os linfócitos naturalmente migram da circulação para as regiões linfóides e vice versa com o intuito de manter o balanço imune. A CX<sub>3</sub>CR1 (conhecida como fractalcina/neurotactina) é uma proteína ligada à proteína G que pode ser utilizada como marcador do processo de migração celular, sendo expressa nas células NK, nos sub-tipos de linfócitos T, monócitos/macrófagos e nas células dendríticas (Imai, Hieshima *et al.*, 1997; Auffray, Fogg *et al.*, 2009). A interação da CX<sub>3</sub>CR1 e seu ligante intermediam o processo de adesão e migração destas células (Imai, Hieshima *et al.*, 1997; Auffray, Fogg *et al.*, 2009). No entanto, se o exercício resistido (ER) pode atuar como um estímulo fisiológico suficiente para induzir a apoptose e migração nos linfócitos T CD4+ e CD8+.

Os estudos prévios focaram em elucidar a resposta imune especialmente a exercícios aeróbios e anaeróbios, utilizando principalmente a bicicleta ergométrica, a esteira e corrida, com um número menor de investigações científicas conduzidas sobre os efeitos do ER (Gabriel, Urhausen *et al.*, 1991; Mayhew, Thyfault *et al.*, 2005; Navalta, Sedlock *et al.*, 2005; Navalta, Sedlock e Park, 2007). Os resultados das alterações leucocitárias após o ER são inconsistentes principalmente devido a grande variabilidade de protocolos utilizados (Nieman, Henson *et al.*, 1995; Dohi, Mastro *et al.*, 2001; Koch, Potteiger *et al.*, 2001). O *American College of Sports Medicine (ACSM)* (2009) ressalta os benefícios do ER na melhora da saúde, da aptidão física e da expectativa de vida de praticantes regulares (American College of Sports, 2009). Os principais benefícios associados ao ER estão o aumento de força, de potência, de endurance muscular e de massa livre de gordura, as quais são desenvolvidas com a manipulação das variáveis do ER, como a ordem dos exercícios, o número de séries, a intensidade e o intervalo de recuperação (American College of Sports, 2009). Por exemplo, Mayhew *et al.* (2005) demonstraram que com curtos intervalos (1 minuto) entre as séries induziu alterações de maior magnitude na contagem das células imunes comparado a intervalos mais longos (3 minutos) (Mayhew, Thyfault *et al.*, 2005). No entanto, os autores prescreveram a sessão com 10 séries de 10 repetições a 65% de uma repetição máxima (1 RM) no *leg press*, o qual não é condizente com as recomendações do ACSM (2009) (American College of Sports, 2009). Além disso, a maioria dos estudos os quais investigaram os efeitos do ER sobre a função imune,

analisaram as variações da contagem total das células imunes e somente um estudo que mostrou alterações da contagem celular e aumento da apoptose após uma sessão de ER de alta intensidade (Kruger, Agnischock *et al.*, 2011).

Kruger *et al.* (2011) demonstraram que apesar da grande área de aplicação e das diferentes populações que praticam o ER, pouco se conhece sobre os efeitos positivos ou negativos do ER sobre a função imune. Os estudos que focaram os efeitos do ER foram geralmente elaborados para induzir dano muscular ou foram realizados com metodologias de treino não usuais, as quais não refletem as recomendações adequadas de prescrição (Yarrow, Borsa *et al.*, 2007). Dessa forma, o entendimento e a caracterização da resposta imune com o ER prescrito para indivíduos destreinados pode adicionar novas informações relevantes sobre a dose-resposta focando em outras variáveis fisiológicas, ao invés de analisar apenas parâmetros neuromusculares, cardiorrespiratórios e/ou metabólicos.

Dessa forma, o objetivo dos pesquisadores do presente estudo foi investigar os efeitos agudos de uma sessão de ER prescrito segundo as recomendações do ACSM (2009) sobre a apoptose e migração de linfócitos T CD4+ e CD8+. Um objetivo secundário foi investigar a resposta destas células imunes a diferentes intervalos de recuperação (1 minuto e 3 minutos) entre as séries e exercícios. Desse modo, hipotetizamos que os linfócitos T CD8+ exibiriam resposta mais exarcebada da apoptose e da migração, especialmente no período inicial da recuperação pós-exercício (até 2 horas), com maior magnitude de respostas ao intervalo de 1 minuto.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Sujeitos

Participaram voluntariamente do estudo 12 sujeitos jovens saudáveis destreinados do sexo masculino (n = 3) e feminino (n = 9). Como previamente demonstrado, o gênero ou as fases do ciclo menstrual não influenciam a apoptose de linfócitos induzida pelo exercício físico (Navalta, Sedlock, Park *et al.*, 2007). Os detalhes do tamanho do efeito para as variáveis estão disponíveis na seção de análise estatística.

Os sujeitos foram classificados como destreinados ao ER segundo as recomendações do ACSM (2009), ou seja, eles não possuíam experiência prévia com ER. Ademais, as mulheres não estavam sob a utilização de qualquer contraceptivo nos últimos 6 meses. Os sujeitos informaram que não utilizavam medicamentos, suplementos dietéticos, esteróides anabólicos, álcool e tabaco, e estavam livres de doenças cardiovasculares, musculares e imunes. O comitê de ética da *Western Kentucky University* aprovou todos os procedimentos realizados no estudo e os sujeitos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (HS12-053). O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki. As características antropométricas, da composição corporal e hemodinâmicas dos sujeitos estão disponíveis na tabela 1.

Tabela 1. Características antropométricas, da composição corporal e hemodinâmica dos sujeitos (n = 12).

<b>Variáveis antropométricas</b>	<b>média ± desvio padrão</b>
Idade (anos)	20,7 ± 0,8
Massa corporal (kg)	73,9 ± 19,3
Estatura (m)	1,70 ± 0,07
<b>Variáveis da composição corporal</b>	
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	25,2 ± 5,3
Gordura corporal (%)	15,8 ± 6,0

Massa livre de gordura (kg)	58,5 ± 8,9
Massa gorda (kg)	11,4 ± 5,6
Espessura das sete dobras cutâneas (mm)	135,0 ± 57,8
<b>Variáveis hemodinâmicas</b>	
Pressão arterial sistólica (mmHg)	110,0 ± 7,6
Pressão arterial diastólica (mmHg)	64,0 ± 6,3
Frequência cardíaca (bpm)	70,7 ± 8,7

---

### **Desenho experimental do estudo**

Os sujeitos realizaram oito sessões de testes e foram orientados a evitar atividade física intensa durante o estudo. Brevemente, a primeira visita consistiu da avaliação antropométrica, composição corporal, hemodinâmica e sessão de familiarização aos exercícios. Os sujeitos retornaram após 72 horas para a segunda sessão de familiarização. Da terceira até a sexta sessão foram realizados os testes de 10-repetições máxima (10 RM). Os exercícios testados foram: voador (*pec deck*), *leg press*, puxador *pull-down*, cadeira extensora, remada em pé com barra, cadeira flexora, flexão plantar sentado e flexão de cotovelo. No sétimo e oitavo dias, as sessões de ER foram randomicamente realizadas com dois intervalos de recuperação diferentes (1 minuto, Hiper-1 e 3 minutos, Hiper-3) separados por cinco dias. Antes de cada sessão, os sujeitos permaneceram sentados durante 10 minutos e coleta da amostra sanguínea (Pré). As amostras sanguíneas foram obtidas em três pontos adicionais: imediatamente pós-exercício (Pós), 2 horas (2h Pós) e 24 horas (24h Pós) após a sessão. Os sub-tipos de linfócitos investigados são descritos abaixo.

### **Avaliação antropométrica, composição corporal e hemodinâmica**

A estatura foi determinada utilizando o estadiômetro fixado na parede. A massa corporal foi medida utilizando a escala digital calibrada, as dobras cutâneas

foram mensuradas com compasso Lange (Beta Technology Inc., Cambridge, MA) e o percentual de gordura estimado com a equação de sete dobras cutâneas. A pressão arterial sistólica e diastólica foram medidas com o estetoscópio e esfigmomanômetro devidamente calibrados.

### **Familiarização e teste de 10 repetições máximas**

Durante a familiarização, os sujeitos receberam instruções padronizadas sobre a técnica de execução e realizaram um exercício (3 séries de 10-12 repetições submáximas) para cada grupo muscular. Após a familiarização, os testes de 10 RM foram realizados em todos os exercícios utilizando uma ordem contrabalanceada em quatro diferentes dias separados por no mínimo 72 horas. A carga mais alta determinada no teste foi considerada a 10 RM. Nenhum exercício foi permitido entre as 72 horas entre os testes para evitar interferência na reprodutibilidade teste-reteste. Para minimizar os possíveis erros durante os testes, as seguintes estratégias foram adotadas: a) instruções padronizadas a respeito de todos os testes e procedimentos; b) a massa de todas as anilhas e barras foram determinadas previamente com escala de precisão. A carga para 10 RM foi determinada em cinco tentativas máximas separadas por um intervalo de 5 minutos entre as séries e 10 minutos entre os exercícios. Em cada teste e reteste, os exercícios foram testados em ordem contrabalanceada e alternados por segmento corporal. Todos os testes e retestes foram realizados no mesmo horário do dia. O coeficiente de correlação intra-classe (modelo 1.1 de análise de variância simples) demonstrou ótima reprodutibilidade dos exercícios testados ( $R \geq 0,98$ ).

### **Sessões de exercício resistido**

Aproximadamente cinco dias após a familiarização e testes, uma nova amostra sanguínea no mesmo momento do dia foi coletada (dados não apresentados). Este procedimento assegurou que a familiarização e testes de 10 RM

não modificaram os parâmetros imunes avaliados. Após o aquecimento (série de 10 repetições no *pec deck* a 40% de 10 RM), todos os sujeitos completaram a primeira sessão de exercícios com nove exercícios na seguinte ordem: *pec deck*, *leg press*, puxador *pull-down*, cadeira extensora, remada em pé com barra, cadeira flexora, flexão plantar sentada e flexão de cotovelo (Cybex International, Medway, MA, USA). Em todos os exercícios, três séries de 10 RM foram realizadas. Foi utilizado o intervalo de 1 minuto ou 3 minutos entre as séries e exercícios. A duração total da sessão Hiper-1 e Hiper-3 foram de aproximadamente 50 e 80 minutos, respectivamente.

Sete dias após a primeira sessão, os sujeitos completaram a segunda sessão com as mesmas recomendações, com exceção do intervalo entre as séries e exercícios (1 minuto ou 3 minutos). Nas duas sessões os participantes foram instruídos a realizar cada repetição na velocidade moderada (3 segundos para o movimento completo). A ordem dos exercícios foi consistente durante todo o estudo. As sessões (Hiper-1 e Hiper-3) e os testes foram supervisionados por um profissional experiente e prescritos de acordo com as recomendações do ACSM (2009) para destreinados em ER.

### **Análise sanguínea**

Todos os anti-corpos e tampões da citometria foram obtidos da e-Bioscience (San Diego, CA, USA). Os sub-tipos de linfócitos T investigados foram: CD4+, CD4+/CD69+, CD8+ e CD8+/CD69+ com marcadores/anti-corpos de superfície celular para Anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1 (BioLegend, San Diego, CA, USA). O protocolo para análise dos sub-tipos de linfócitos sanguíneos foi descrito anteriormente (Navalta, Mcfarlin *et al.*, 2011). Brevemente, uma amostra sanguínea (20 µL) foi adicionada a uma solução de anti-corpo (250 µL) e incubada em sala escura durante 30 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 a 10 minutos, decantadas, sendo adicionado o tampão de lise para células vermelhas e realizada a agitação no vórtex. Após 10 minutos de lise, o tampão com fosfato salino foi adicionado às amostras e estas, então, foram centrifugadas e decantadas. Previamente à análise pela citometria de fluxo (C6, Accuri, Ann Arbor, Mich., USA)

as amostras foram agitadas no vórtex. No mínimo 10.000 eventos foram contados no canal do linfócito, inicialmente determinados pelas características frontal e lateral da imagem. Adicionalmente o canal para distinguir as populações de CD4+ e CD8+ foram determinados no canal FL-2 via fluorocromo PE. Os marcadores para apoptose (Anexina V) e migração (CX<sub>3</sub>CR1) foram detectados em cada sub-fração por meio do fluorocromo FITC no canal FL-1.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de normalidade *Shapiro-Wilk* e de homocedasticidade (*Mauchly*) foram utilizados para testar a normalidade dos dados. Para o controle da esfericidade, a correção de *Greenhouse-Geisser* foi aplicada. As alterações absolutas nos valores do momento Pré ( $\Delta$  basal) foram calculadas segundo a fórmula:  $[(\text{medida-basal}) \cdot \text{basal}^{-1}] \cdot 100$ . Como esperava-se que as mudanças absolutas do momento Pré em relação aos marcadores de apoptose e migração sejam similares as da contagem celular, foi aplicado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O nível de alfa foi ajustado em  $p \leq 0,05$ . As diferenças entre os momentos (Pré, Pós, 2h Pós e 24h Pós) foram determinadas com o teste de análise de variância (ANOVA) e *post hoc* de *Tukey HSD* quando necessário. O poder da análise foi calculado a partir dos dados de Mars et al. (1998), nos quais o aumento em 45% na apoptose celular foi observado após a sessão de exercício (tamanho de efeito = 0,8,  $\alpha = 0,05$ ,  $\beta = 0,80$ ) (Mars, Govender et al., 1998). Portanto, para detectar aumentos na apoptose e na migração, no mínimo 8 sujeitos foram necessários. Toda análise estatística foi realizada no software SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

## RESULTADOS

Enquanto a contagem total de linfócitos T CD4+ tendeu a aumentar no momento Pós ER, nenhuma diferença significativa foi observada nos protocolos

Hiper-1 e Hiper-3 ( $p = 0,35$ ; figura 1A). No entanto, foi observado aumento significativo na porcentagem de linfócitos T CD4+ positivo para Anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1+ nos momentos Pós e 24 horas após o protocolo Hiper-1 ( $p < 0,05$ ), sem diferenças significativas no momento 2 horas após o protocolo Hiper-1 ( $p > 0,05$ ; figura 2A).

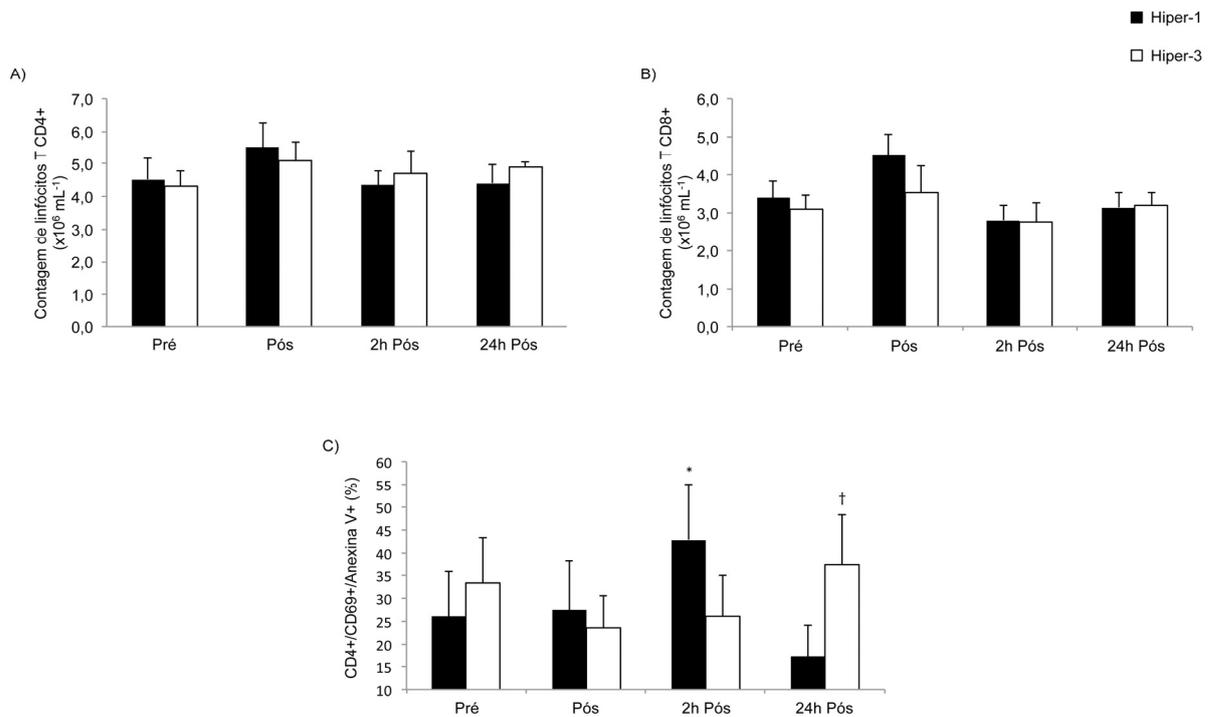


Figura 1. Contagem celular de linfócitos T CD4+ (A), CD8+ (B) e porcentagem de células CD4+/CD69+/Anexina V+ (C) expressos em média  $\pm$  SEM, antes (Pré) imediatamente após (Pós), 2 horas (2h Pós) e 24 horas após (24h Pós) com 1 minuto (Hiper-1) ou 3 minutos (Hiper-3) de intervalo ( $p = 0,35$ ,  $p = 0,75$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). O nível de significância foi determinado pelo teste de medidas repetidas ANOVA. \*diferença estatisticamente significativa entre os momentos ( $p < 0,05$ ), †diferente dos momentos Pós e 2h Pós ( $p < 0,05$ ).

A porcentagem de linfócitos T CD4+ positivo para Anexina V+ aumentou significativamente 2 horas e 24 horas após o protocolo Hiper-3 ( $p < 0,05$ ; figura 2B). Foi observada diminuição significativa nos linfócitos T CD4+ positivo para CX<sub>3</sub>CR1+ 2 horas e 24 horas após o protocolo Hiper-3 ( $p < 0,05$ ; figura 2B). Não foram observadas diferenças significativas nos linfócitos T CD4+ marcados com Anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1+ no momento Pós no protocolo Hiper-3 ( $p > 0,05$ ; figura 2B). O percentual de linfócitos T CD4+/CD69+ marcados com Anexina V+ foi significativamente alterado após o exercício. No protocolo Hiper-1 (1 minuto de intervalo), foi observado aumento significativo na contagem celular total 2 horas após ( $p = 0,05$ , figura 1C). No protocolo Hiper-3 (3 minutos de intervalo) observamos

aumento significativo dos linfócitos T CD4+/CD69+ marcados com Anexina V+ 24 horas após na contagem celular ( $p = 0,05$ , figura 1C).

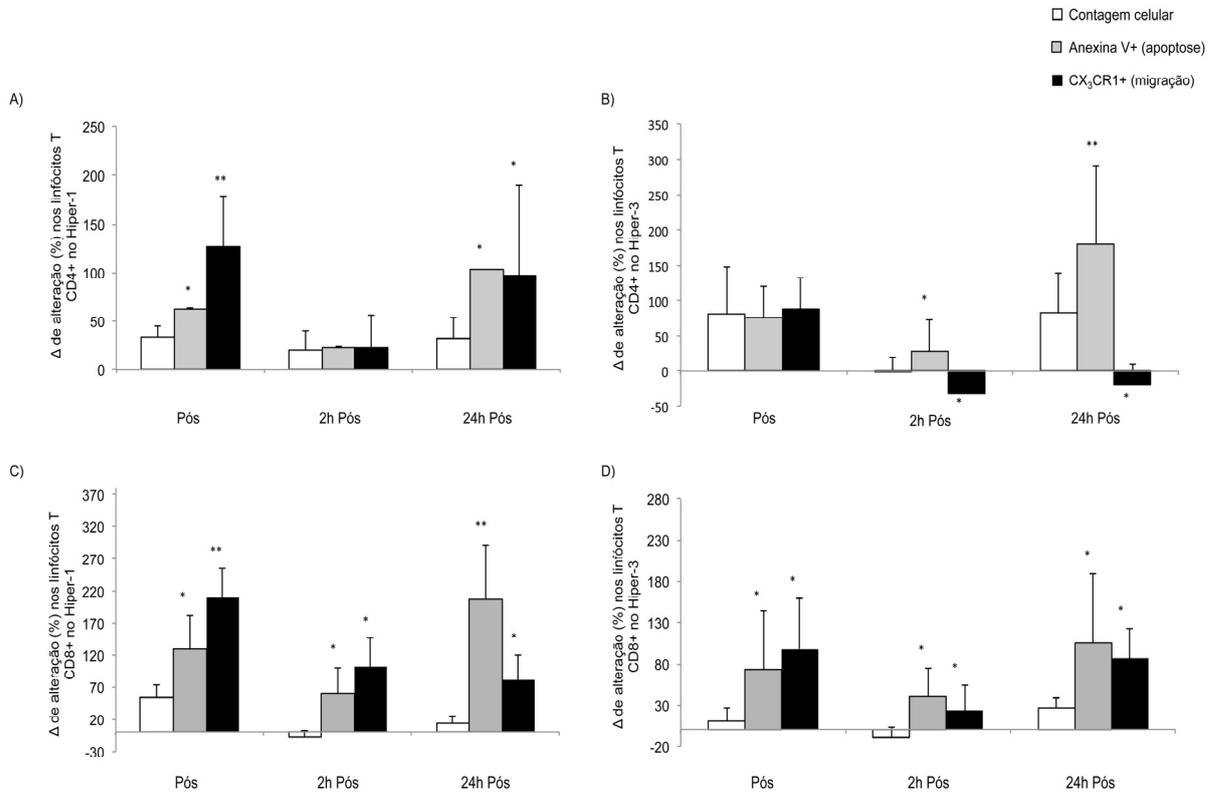


Figura 2. Os dados são expressos em média  $\pm$  SEM para a contagem celular, apoptose (Anexina V+) e migração celular (CX3CR1+) nos linfócitos T CD4+ e CD8+ nos momentos imediatamente após (Pós), 2 horas após (2h) e 24 horas após (24h) as sessões com 1 minuto (Hiper-1) ou 3 minutos (Hiper-3) de recuperação entre as séries e exercícios. O nível de significância foi determinado pelo teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ao comparar as alterações observadas na Anexina V+ e na CX<sub>3</sub>CR1 com as alterações esperadas na contagem celular. \*diferença significativa,  $p < 0,01$ ; \*\*diferença significativa,  $p < 0,001$ .

Similar aos linfócitos T CD4+, a contagem celular total dos linfócitos T CD8+ não sofreu alteração após os protocolos Hiper-1 e Hiper-3 ( $p = 0,75$ ; figura 1B). Foi observado aumento significativo na porcentagem de linfócitos T CD8+ positivo para Anexina V+ e CX<sub>3</sub>CR1+ nos momentos Pós, 2 horas e 24 horas após os protocolos Hiper-1 e Hiper-3 ( $p < 0,05$ ; figura 2C e D). Ao comparar os protocolos Hiper-1 e Hiper-3 nos momentos e marcadores, não observamos diferenças significativas na porcentagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ ( $p > 0,05$ ). Não observamos diferenças significativas nos linfócitos T CD8+/CD69+ marcados com Anexina V+ ( $p > 0,05$ ; dados não apresentados).

## DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro a investigar marcadores de apoptose e migração em sub-tipos de linfócitos T após uma sessão de ER prescrita segundo as recomendações do ACSM (2009) para sujeitos destreinados. A hipótese foi parcialmente confirmada, sendo os principais resultados: a) a recomendação de prescrição do ER segundo o ACSM (2009) pode modular a migração e apoptose de linfócitos CD4+ e CD8+; b) a apoptose e migração dos linfócitos T CD4+ e CD8+ permanecem aumentadas 24 horas após a sessão; c) a contagem celular total dos linfócitos T CD4+ e CD8+ não sofrem modificações imediatamente após, 2 horas e 24 horas após a sessão; d) os linfócitos T CD8+ demonstram maior responsividade à apoptose e migração do que os linfócitos T CD4+ após o exercício; e) o intervalo de recuperação exerce mínimos efeitos sobre a apoptose e migração dos sub-tipos de linfócitos investigados.

O exercício físico induz alterações fisiológicas nas células do sistema imune, incluindo os linfócitos e suas sub-populações (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Pedersen e Toft, 2000; Navalta, Sedlock e Park, 2007; Friedman, Navalta *et al.*, 2012). Estudos prévios observaram que após o exercício físico intenso a resposta imune é caracterizada pela diminuição da contagem total dos linfócitos (linfocitopenia), supressão da função das células associadas com a imunidade inata e supressão da proliferação linfocitária (Nieman, Henson *et al.*, 1995; Pedersen e Toft, 2000). A linfocitopenia observada após o exercício intenso pode ser relacionada e justificada pela eliminação por morte celular programada (apoptose), pelo movimento das células da circulação para outras regiões e tecidos (migração), ou a combinação dos dois fatores. Foi demonstrado que a apoptose ocorre em diversos tipos de células imunes após o exercício de *endurance* de diferentes durações e intensidades, como maratonas, corridas na esteira e cicloergômetro e bem como após ER intenso (Lagadic-Gossmann, Huc *et al.*, 2004; Tuan, Hsu *et al.*, 2008; Kruger, Agnischock *et al.*, 2011). Os mediadores da apoptose de linfócitos estimulados pelo exercício que podem têm sido tema de intensas discussões. Por exemplo, o aumento na lactatemia e nas proteínas de fase aguda, a redução do pH sanguíneo, a elevação nas concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-6, proteína C-reativa e

cortisol durante o exercício são fatores que podem estimular a apoptose de diferentes tipos de células (Huang, Tang *et al.*, 2002; Fujii, Li *et al.*, 2006; Hayes, Bickerstaff *et al.*, 2010), incluindo os linfócitos (Mooren, Lechtermann *et al.*, 2004; Navalta, Sedlock e Park, 2007; Samuvel, Sundararaj *et al.*, 2009). Estes mediadores podem parcialmente explicar o aumento inicial da apoptose nos linfócitos T CD4+ e CD8+ imediatamente após e 2 horas após ao exercício. Surpreendentemente, os resultados do presente estudo revelam que a apoptose de linfócitos T CD4+ e CD8+ permanece elevada até 24 horas após a sessão de ER em indivíduos destreinados, indicando que outros fatores e mecanismos podem estar envolvidos com a regulação da apoptose neste período pós-exercício. Tuan *et al.* (2008) observaram aumento do ligantes do receptor pró-apoptótico (TNF- $\alpha$  e sFasL) 72 horas após três dias consecutivos de corrida na esteira extenuante em indivíduos treinados, mostrando que a sensibilidade à apoptose pode permanecer elevada mesmo após três dias de exercício (Tuan, Hsu *et al.*, 2008). Ademais, o exercício intenso (40 minutos de cicloergômetro a 80% do VO<sub>2</sub>max) pode comprometer a resistência celular à apoptose induzida pelo estresse oxidativo e aumentar a atividade de proteínas intracelulares pró-apoptóticas como caspase-8, caspase-9 e caspase-3 de linfócitos por várias horas após a sessão (Wang e Huang, 2005).

Na literatura científica há poucos estudos que investigaram as respostas à apoptose após o ER. Boroujerdi e Rahimi (2011) observaram que 4 séries de 5 exercícios (supino reto, *leg press*, puxador costas, flexão de cotovelo e desenvolvimento de ombros) a 65 – 80% de 1 RM não alteram significativamente as concentrações séricas da caspase-3 e caspase-9 em indivíduos treinados. No entanto, os parâmetros imunes específicos ao nosso estudo não foram investigados, e foi utilizado um período de intervalo de 2 minutos entre as séries com a velocidade de execução de 1 segundo para concêntrica e 3 segundos para excêntrica (Boroujerdi e Rahimi, 2011). Em contrapartida, Krüger *et al.* (2011) compararam os efeitos de duas intensidades diferentes (60% *versus* 75% de 1 RM) sobre a apoptose de linfócitos totais (Krüger, Agnischock *et al.*, 2011). Os resultados revelaram aumento da apoptose marcada pela Anexina V+ 3 horas após a sessão a 75% de 1 RM mas não a 60% de 1 RM, com retorno aos valores basais em menos de 24 horas. Adicionalmente, o aumento na apoptose foi significativamente correlacionada com a elevação dos níveis de cortisol 3 horas após a sessão. Estes resultados são diferentes do presente estudo, no qual observamos aumento da

porcentagem de apoptose em linfócitos T CD4+ e CD8+ por mais de 24 horas após a sessão. Esta diferença pode ser atribuída a utilização da Anexina V+ na contagem dos linfócitos totais e não especificamente em seus sub-tipos, ao protocolo de exercício utilizado e a população investigada.

As células imunes podem migrar para diferentes compartimentos corporais, como, por exemplo, para a circulação e linfonodos, com o objetivo de regular a homeostase do sistema nos diferentes compartimentos. A linfocitopenia pós-exercício já está bem documentada e pode ser relacionada ao egresso dos linfócitos do compartimento vascular para os outros tecidos (Kruger, Frost *et al.*, 2009). Nossos dados demonstram aumento do marcador celular de migração em linfócitos T CD4+ e CD8+ 24 horas após a sessão. Simpson *et al.* (2007) observaram que após uma corrida em declive de elevada intensidade, os sub-tipos de linfócitos podem migrar para outros compartimentos corporais, sendo a migração um fator contribuinte e responsável pela linfocitopenia (Simpson, Florida-James *et al.*, 2007). Além disso, Friedman *et al.* (2012) investigaram os efeitos de sessões intermitentes intensas sobre a migração de linfócitos (Friedman, Navalta *et al.*, 2012). Os autores observaram redução nos linfócitos T CD8+ e CD8+/CD45RA acompanhada pelo aumento do marcador de migração sem alteração no marcador de apoptose (Friedman, Navalta *et al.*, 2012). Estes resultados são consistentes com as investigações prévias e com o presente estudo, reforçando a ideia da participação da migração linfocitária por meio da ativação de marcadores de adesão celular em sujeitos que realizam uma sessão de exercício (Hong, Johnson *et al.*, 2005; Simpson, Florida-James *et al.*, 2006; Simpson, Florida-James *et al.*, 2007). Por fim, estes eventos, a apoptose e a migração linfocitária, podem estar associados e/ou obedecerem a um resposta fisiológica temporal ao exercício.

Os linfócitos T CD8+ apresentam maior responsividade à apoptose e à migração após uma sessão de ER do que os linfócitos T CD4+. De fato, foi demonstrado que o exercício físico pode afetar a redistribuição dos linfócitos T CD8+ em maior magnitude comparado aos linfócitos T CD4+, provavelmente devido aos efeitos da adrenalina, uma vez que os linfócitos T CD8+ possuem uma maior densidade de receptores  $\beta$ 2-adrenérgicos (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Ibfelt, Petersen *et al.*, 2002). Adicionalmente, Friedman *et al.* (2012) recentemente observaram que o exercício físico intenso induz a linfocitose de células CD8+ e CD8RA+ acompanhada mais de migração celular do que apoptose (Friedman,

Navalta *et al.*, 2012). É possível que esta maior responsividade à migração represente um mecanismo de proteção aos linfócitos T CD8+ com preferência para a migração para ao órgão linfóide do que para a deleção por meio da apoptose, uma vez que estas células possuem a habilidade iniciar uma resposta imune subsequente a um antígeno. No entanto, os resultados do presente estudo revelam que os marcadores de apoptose como os de migração permanecem elevados 24 horas após a sessão de exercício. Uma plausível explicação para estes resultados pode ser o retorno destas células dos compartimentos linfóides e não-linfóides novamente para circulação, e possivelmente o atraso na apoptose circulatória e/ou tecidual, considerando que a contagem celular total permanece estável durante todos os momentos analisados (Kruger, Frost *et al.*, 2009). Igualmente, Krüger *et al.* (2009) sugerem que a apoptose de linfócitos induzida pelo exercício pode ser um mecanismo regulatório para remover células imunes excessivamente ativadas e potencialmente auto-reativas (Kruger, Frost *et al.*, 2009). O presente estudo fornece suporte a este mecanismo com relação ao linfócito T CD4+, pois observamos um aumento significativo de linfócitos T auxiliares ativados com o marcador de apoptose (CD4+/CD69+/Anexina V+) 2 horas e 24 horas após a sessão de exercício. Finalmente e não menos importante, a “*immune space theory*” indica que uma sessão de exercício físico pode “criar um espaço imune” por meio da remoção de linfócitos T com excessivas divisões celulares e potencialmente auto-reativos criando um espaço livre para o aumento do repertório de linfócitos T jovens produzidos pela medula óssea (Simpson, 2011).

Ademais, um limitado número de evidências científicas demonstrou até que ponto alterações imunológicas induzidas pelo exercício alteram a susceptibilidade a doenças, como por exemplo a infecção pelo vírus da Herpes Simplex e ao vírus Influenza (Walsh, Gleeson *et al.*, 2011). O significado clínico destas alterações imunológicas induzidas pelo exercício sobre a imunidade inata e adquirida permanecem desconhecidos. As sessões de exercício moderado (por exemplo, o recomendado pelo ACSM) possuem pequeno impacto sobre a imunidade da mucosa nasal, enquanto que sessões prolongadas e de alta intensidade (por exemplo, atletas de elite em prova de ultra-endurance) induzem redução da secreção da imunoglobulina A (SIgA) na saliva, a qual representa a defesa imune na mucosa, sendo a primeira linha de defesa contra patógenos (Walsh, Gleeson *et al.*, 2011). Sabemos que concentrações reduzidas de SIgA salivar estão associadas ao risco

aumentado de infecções do trato aéreo superior durante treinamento de alta intensidade. Futuros estudos devem ser elaborados com desafios imunológicos aos participantes, com o estímulo ao antígeno (influenza ou *keyhole limpet haemocyanin*, proteína imunoestimulante altamente potente) e avaliação da resposta imune, incluindo marcadores da resposta celular específica ao antígeno circulatório. Ainda precisa ser determinado se esta combinação de variáveis e resposta ao exercício físico são suficientes para alterar a capacidade defensiva do organismo, ou aumentar susceptibilidade e severidade de doenças ainda permanece pouco conhecida.

O presente estudo possui algumas limitações que devem ser abordadas. Foi investigado um pequeno número das células imunes expressando marcadores particulares da superfície celular que são associados a apoptose e migração celular. Não foi investigado se estas células efetivamente migraram ou entraram em morte celular no endotélio vascular ou nos tecidos. Além disso, vale mencionar a ausência da medida de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), hormônios (cortisol e adrenalina) e avaliação do estresse oxidativo os quais podem contribuir para o melhor entendimento fisiológico e importância dos resultados.

Em conclusão, apesar das sessões de ER do presente estudo terem sido prescritas de acordo com as recomendações do ACSM (2009) para destreinados, foi observada apoptose e migração de linfócitos T CD4+ e CD8+ imediatamente após, 2 horas e 24 horas após a sessão, com mínimos efeitos do intervalo de recuperação entre as séries e os exercícios. Estes resultados revelam um novo entendimento, mostrando que o protocolo proposto possui dose-resposta suficiente para ativar os linfócitos T e modificar marcadores celulares da apoptose, migração e ativação. Os futuros estudos devem ser elaborados para investigar se este aumento na apoptose e na migração são acompanhados pela reposição de linfócitos T jovens provenientes da medula óssea.

## AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao *Department of Kinesiology, Recreation, and Sport* da *Western Kentucky University*.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204579> >.

AUFFRAY, C. et al. CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. **J Exp Med**, v. 206, n. 3, p. 595-606, Mar 16 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273628> >.

BOROUJERDI, S. S.; RAHIMI, R. The apoptotic response to resistance exercise with different intensities in athletes. **Medicina dello sport**, v. 64, n. 1, p. 13, 2011. ISSN 1827-1863.

DOHI, K. et al. Lymphocyte proliferation in response to acute heavy resistance exercise in women: influence of muscle strength and total work. **Eur J Appl Physiol**, v. 85, n. 3-4, p. 367-73, Aug 2001. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560093> >.

FRIEDMAN, R. A. et al. Repeated high-intensity Wingate cycle bouts influence markers of lymphocyte migration but not apoptosis. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 37, n. 2, p. 241-6, Apr 2012. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22380726> >.

FUJII, H. et al. C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 11, p. 2476-82, Nov 2006. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931792> >.

GABRIEL, H.; URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. **Eur J Appl Physiol Occup Physiol**, v. 63, n. 6, p. 449-57, 1991. ISSN 0301-5548 (Print) 0301-5548 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1837265> >.

GRUJIC, M. et al. The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. **J Immunol**, v. 185, n. 3, p. 1730-43, Aug 1 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601595> >.

HAYES, L. D.; BICKERSTAFF, G. F.; BAKER, J. S. Interactions of cortisol, testosterone, and resistance training: influence of circadian rhythms. **Chronobiol Int**, v. 27, n. 4, p. 675-705, Jun 2010. ISSN 1525-6073 (Electronic) 0742-0528 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20560706> >.

HONG, S. et al. Attenuation of T-lymphocyte demargination and adhesion molecule expression in response to moderate exercise in physically fit individuals. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 3, p. 1057-63, Mar 2005. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15501922> >.

HUANG, S. C. et al. Fas and its ligand, caspases, and bcl-2 expression in gonadotropin-releasing hormone agonist-treated uterine leiomyoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 87, n. 10, p. 4580-6, Oct 2002. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364438> >.

IBFELT, T. et al. Exercise-induced change in type 1 cytokine-producing CD8+ T cells is related to a decrease in memory T cells. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 2, p. 645-8, Aug 2002. ISSN 8750-7587 (Print) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133875> >.

IMAI, T. et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 521-30, Nov 14 1997. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390561> >.

KOCH, A. J. et al. Minimal influence of carbohydrate ingestion on the immune response following acute resistance exercise. **Int J Sport Nutr Exerc Metab**, v. 11, n. 2, p. 149-61, Jun 2001. ISSN 1526-484X (Print) 1526-484X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11402249> >.

KRUGER, K. et al. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. **J Appl Physiol**, v. 110, n. 5, p. 1226-32, May 2011. ISSN 1522-1601 (Electronic) 0161-7567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21393471> >.

KRUGER, K. et al. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 5, p. R1518-27, May 2009. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261913> >.

LAGADIC-GOSSMANN, D.; HUC, L.; LECUREUR, V. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 9, p. 953-61, Sep 2004. ISSN 1350-9047 (Print) 1350-9047 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15195071> >.

MARS, M. et al. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 249, n. 2, p. 366-70, Aug 19 1998. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712702> >.

MAYHEW, D. L.; THYFAULT, J. P.; KOCH, A. J. Rest-interval length affects leukocyte levels during heavy resistance exercise. **J Strength Cond Res**, v. 19, n. 1, p. 16-22, Feb 2005. ISSN 1064-8011 (Print) 1064-8011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705028> >.

MOOREN, F. C.; LECHTERMANN, A.; VOLKER, K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 9, p. 1476-83, Sep 2004. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15354026> >.

NAVALTA, J. et al. Finger-stick blood sampling methodology for the determination of exercise-induced lymphocyte apoptosis. **J Vis Exp**, n. 48, 2011. ISSN 1940-087X (Electronic) 1940-087X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21403625> >.

NAVALTA, J. W.; SEDLOCK, D. A.; PARK, K. S. Blood treatment influences the yield of apoptotic lymphocytes after maximal exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 37, n. 3, p. 369-73, Mar 2005. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741833> >.

NAVALTA, J. W.; SEDLOCK, D. A.; PARK, K. S. Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. **Int J Sports Med**, v. 28, n. 6, p. 539-42, Jun 2007. ISSN 0172-4622 (Print) 0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357968> >.

NAVALTA, J. W. et al. Neither gender nor menstrual cycle phase influences exercise-induced lymphocyte apoptosis in untrained subjects. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n. 3, p. 481-6, Jun 2007. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510683> >.

NIEMAN, D. C. et al. The acute immune response to exhaustive resistance exercise. **Int J Sports Med**, v. 16, n. 5, p. 322-8, Jul 1995. ISSN 0172-4622 (Print) 0172-4622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7558530> >.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1055-81, Jul 2000. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893431> >.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med**, v. 34, n. 4, p. 246-51, Aug 2000. ISSN 0306-3674 (Print) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953894> >.

SAMUVEL, D. J. et al. Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 2476-84, Feb 15 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201903> >.

SEKINE, C. et al. Differential regulation of splenic CD8- dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands. **Int Immunol**, v. 21, n. 3, p. 295-301, Mar 2009. ISSN 1460-2377 (Electronic) 0953-8178 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19181931> >.

SIMPSON, R. J. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise "make space"? **Exerc Sport Sci Rev**, v. 39, n. 1, p. 23-33, Jan 2011. ISSN 1538-3008 (Electronic) 0091-6331 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088603> >.

SIMPSON, R. J. et al. Apoptosis does not contribute to the blood lymphocytopenia observed after intensive and downhill treadmill running in humans. **Res Sports Med**,

v. 15, n. 3, p. 157-74, Jul-Sep 2007. ISSN 1543-8627 (Print) 1543-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17987505> >.

SIMPSON, R. J. et al. The effects of intensive, moderate and downhill treadmill running on human blood lymphocytes expressing the adhesion/activation molecules CD54 (ICAM-1), CD18 (beta2 integrin) and CD53. **Eur J Appl Physiol**, v. 97, n. 1, p. 109-21, May 2006. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16506060> >.

TUAN, T. C. et al. Deleterious effects of short-term, high-intensity exercise on immune function: evidence from leucocyte mitochondrial alterations and apoptosis. **Br J Sports Med**, v. 42, n. 1, p. 11-5, Jan 2008. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17504785> >.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21446352> >.

WANG, J. S.; HUANG, Y. H. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. **Eur J Appl Physiol**, v. 95, n. 4, p. 290-7, Oct 2005. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096840> >.

YARROW, J. F. et al. Neuroendocrine responses to an acute bout of eccentric-enhanced resistance exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 6, p. 941-7, Jun 2007. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17545883> >.

**MANUSCRITO II**

**MANUSCRITO II****EFEITOS AGUDOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO SOBRE A  
OSTEOPROTEGERINA E CITOCINAS EM MULHERES COM  
SÍNDROME METABÓLICA**

Guilherme Borges Pereira<sup>1</sup>, Ramires Alsamir Tibana<sup>2</sup>, James Navalta<sup>3</sup>, Nuno Manuel Frade de Sousa<sup>1</sup>, Claudio Córdova<sup>2</sup>, Vinícius C. Souza<sup>4</sup>, Otávio T. Nóbrega<sup>4</sup>, Jonato Prestes<sup>2</sup>, Sergio Eduardo de Andrade Perez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil.

<sup>3</sup> Department of Kinesiology and Nutrition Sciences of the University of Nevada, Las Vegas, Nevada, United States of America.

<sup>4</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil.

## RESUMO

A inflamação crônica têm sido identificada como um importante componente da Síndrome Metabólica (MetS). A inibição dos sinais mediadores da inflamação é uma estratégia promissora contra a resistência à insulina, aterosclerose e outras complicações associadas com a Síndrome Metabólica. O exercício físico regular diminui os componentes associados com a Síndrome Metabólica, incluindo as citocinas inflamatórias no entanto, a relação entre uma sessão aguda de exercício resistido (ER), os níveis de citocinas e Síndrome Metabólica permanecem incertos. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de uma sessão aguda de ER sobre os níveis de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 e osteoprotegerina (OPG) em mulheres com MetS. Vinte e quatro mulheres adultas foram divididas em dois grupos: Síndrome Metabólica (MetS) e não-Síndrome Metabólica (não-MetS). Após a familiarização e testes de 1 repetição máxima (1 RM), as participantes completaram 3 séries de 10 repetições com 1 minuto de intervalo entre as séries e repetições nos seguintes exercícios: *leg press* 45°, cadeira extensora, cadeira flexora, supino vertical na máquina, puxador no *pulley* e desenvolvimento de ombros com 60% de 1 RM seguido de 15 repetições de abdominais. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 e OPG plasmáticos foram medidos antes, imediatamente após e 60 minutos após a sessão de RT. O grupo MetS demonstrou aumento nas concentrações de IL-1 $\beta$  ( $p = 0,024$ ), IL-6 ( $p = 0,049$ ) e tendência para os valores de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,092$ ) comparado com o grupo não-MetS. Não houve interação grupo *versus* tempo após a sessão de ER sobre as concentrações de citocinas e OPG medidas. Em conclusão, uma sessão aguda de ER não induz um aumento adicional das citocinas pró-inflamatórias e redução das anti-inflamatórias e OPG em mulheres com Síndrome Metabólica.

**Palavras-chave:** síndrome X; citocinas; osteoprotegerina; inflamação crônica; treinamento resistido.

## ABSTRACT

Chronic inflammation has been identified as an important component of Metabolic Syndrome (MetS). Inhibition of the inflammatory mediator signals is a promising strategy against insulin resistance, atherosclerosis, and other problems associated with MetS. Regular exercise decreases the components associated with MetS, including inflammatory cytokines. However, the relationship between an acute resistance training (RT) session, cytokine levels, and MetS is unclear. Therefore the aim was to evaluate the effects of a single bout of acute RT on tumor necrosis factor alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 and osteoprotegerin (OPG) in women with MetS. Twenty-four women were divided into 2 groups: Metabolic Syndrome (MetS) and non-Metabolic Syndrome (Non-MetS). After the familiarization and testing for one repetition maximum (1 RM), participants completed 3 sets of 10 repetitions in the following exercises: leg press 45°, leg extension, leg curl, chest press, front lat pull-down and machine shoulder press with 60% of 1RM followed by 15 repetitions of abdominal crunches. A rest interval of one minute was allowed between sets and exercises. Plasma TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 and OPG were measured before, immediately post, and 60 minutes after RT. MetS group showed significantly higher concentrations of IL-1 $\beta$  ( $P=.024$ ), IL-6 ( $P=.049$ ) and a trend for higher TNF- $\alpha$  values ( $P=.092$ ) compared with Non-MetS. There was no group versus time interactions after the RT session on the measured cytokines and OPG. In conclusion, acute RT session induced no additional increase of pro- nor a decrease of anti-inflammatory cytokines and OPG in women with MetS.

**Keywords:** metabolic syndrome; cytokines; osteoprotegerin; chronic inflammation; resistance training.

## INTRODUÇÃO

Em todo o mundo tem sido reportado aumento o dramático da prevalência da obesidade (Catenacci, Hill *et al.*, 2009). Além disso, a obesidade é associada ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2 e Síndrome Metabólica (Guh, Zhang *et al.*, 2009). O estado crônico de inflamação sistêmica de baixa intensidade é uma das alterações metabólicas associadas à ingestão calórica excessiva, ao aumento da adiposidade e à redução dos níveis de atividade física que são envolvidos na fisiopatologia da Síndrome Metabólica. Portanto, grande parte do desenvolvimento dos componentes da Síndrome Metabólica é primariamente associada à inflamação sistêmica de baixa intensidade crônica. Por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral do tipo alfa (TNF- $\alpha$ ) juntamente com a Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-1 do tipo beta (IL-1 $\beta$ ) desempenham um papel central nos processos inflamatórios e na resposta imune (Dinarello, 1996). Adicionalmente, estas citocinas inflamatórias quando associadas à inflamação sistêmica de baixa intensidade crônica contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, resistência à insulina e da hipertensão, alterações que são componentes para o diagnóstico da Síndrome Metabólica (Festa, D'agostino *et al.*, 2000; Robbie e Libby, 2001).

O Exercício Resistido (ER) é um potente ativador do sistema imune responsável pela modulação das concentrações de citocinas pró e anti-inflamatórias (Mathur e Pedersen, 2008; Beavers, Brinkley *et al.*, 2010). Investigações anteriores têm demonstrado que o treinamento físico crônico pode diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumentar a ação de mediadores anti-inflamatórios, o qual confere ao exercício uma importante estratégia não-farmacológica para reduzir a longo prazo o desenvolvimento da Síndrome Metabólica (Mathur e Pedersen, 2008; Beavers, Brinkley *et al.*, 2010). Em contra partida, há evidências limitadas e controversas a respeito dos efeitos agudos de uma sessão de ER sobre os mediadores inflamatórios em mulheres diagnosticadas com Síndrome Metabólica (Mathur e Pedersen, 2008; Calle e Fernandez, 2010).

Geralmente, quando a IL-6 é secretada pelo músculo esquelético durante o ER, há um aumento circulante de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e o

antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e diminuição em IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  várias horas após a sessão (Mathur e Pedersen, 2008; Brandt e Pedersen, 2010). No entanto, estudos com ER empregaram uma grande variedade de protocolos, de diferentes intensidades e grupos musculares, e em geral falharam em demonstrar consistência nos resultados na maioria das citocinas circulantes medidas após uma sessão aguda em indivíduos destreinados ou treinados saudáveis (Hirose, Nosaka *et al.*, 2004; Peake, Nosaka *et al.*, 2006; Bloomer, 2007; Buford, Cooke *et al.*, 2009; Uchida, Nosaka *et al.*, 2009; Calle e Fernandez, 2010). Uma possível explicação pode ser relacionada aos intervalos para a coleta das amostras sanguíneas, onde pode ter ocorrido o *clearance* das citocinas antes de terem sido medidas. Izquierdo *et al.* (2009) sugerem que a coleta das amostras sanguíneas deve ocorrer imediatamente, 1, 2, 4 e 6 h após a sessão permitindo a cobertura da cinética imediata das citocinas (Izquierdo, Ibanez *et al.*, 2009). Ademais, os protocolos aplicados na maioria das investigações não correspondem aos exercícios diariamente utilizados em academias e clínicas de reabilitação (Kraemer, Adams *et al.*, 2002) para indivíduos saudáveis ou com alguma doença. Por fim, os efeitos agudos de uma sessão de exercício sobre as citocinas podem ser diferentes em pacientes com Síndrome Metabólica, os quais apresentam inflamação sistêmica crônica de baixa intensidade. O primeiro passo para o melhor entendimento é investigar os ajustes metabólicos e o reparo celular iniciados com uma sessão prescrita adequadamente, como por exemplo a resposta das citocinas ao ER em pacientes com Síndrome Metabólica. Estes resultados podem melhorar o entendimento das respostas fisiológicas ao treinamento crônico, segurança e prescrição do ER.

A Osteoprotegerina (OPG) é uma glicoproteína com afinidade ao receptor da superfamília do TNF com função de bloquear o receptor (Reid e Holen, 2009). Nesse sentido, a OPG é associada com a fisiopatologia da obesidade, aterosclerose, diabetes do tipo 2, doença arterial coronariana e disfunção endotelial (Nabipour, Kalantarhormozi *et al.*, 2010; Blazquez-Medela, Lopez-Novoa *et al.*, 2011). Ainda que estudos prévios demonstrem os efeitos do ER sobre as citocinas, há poucas evidências científicas a respeito da relação entre OPG, citocinas e pacientes com Síndrome Metabólica. Em pacientes com doença arterial periférica, a concentração sérica de OPG está acima dos valores fisiológicos e foi associada à obesidade e à Síndrome Metabólica (Golledge, Leicht *et al.*, 2008). Em contrapartida, ao investigar

homens idosos não foram observadas diferenças estatísticas entre idosos saudáveis ou com Síndrome Metabólica nos níveis séricos de OPG (Gannage-Yared, Fares *et al.*, 2006).

Dessa forma, o objetivo dos pesquisadores deste estudo foi investigar o efeito agudo de uma sessão de ER sobre as concentrações séricas das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 e OPG imediatamente após e 60 minutos pós-sessão. Nós hipotetizamos que pacientes com Síndrome Metabólica exibiriam maiores valores basais nas citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 do que os participantes saudáveis, e que a sessão aguda aumentaria os valores de IL-10 (anti-inflamatória) e OPG, e redução na concentração das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 e IL-6) principalmente nos pacientes com Síndrome Metabólica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Participantes

Trinta e duas mulheres sedentárias na meia-idade (com menos de 2 h por semana de atividade física nos últimos 12 meses) foram recrutadas voluntariamente da comunidade local. As participantes foram classificadas como sobrepeso e obesas de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC) da Organização Mundial de Saúde (disponível em: <http://www.idf.org>, acessado: 11/09/2012). Em cada participante foi realizado uma avaliação médica, o exame físico completo, o eletrocardiograma de repouso e exercício, a avaliação da pressão arterial previamente aos protocolos experimentais do estudo. Os critérios de exclusão adotados foram: deficiências físicas, doenças músculo-esqueléticas, uso recente e regular de medicamento, tabaco, drogas e abuso de álcool. Após a seleção inicial, foram selecionadas 24 participantes para o estudo. Os detalhes do tamanho do efeito (*effect size*) estão disponíveis na seção de análise estatística.

As participantes foram divididas em dois grupos: sem-Síndrome Metabólica (Não-MetS) e Síndrome Metabólica (MetS). O grupo MetS foi definido pela presença

de no mínimo três fatores de risco cardiovascular de acordo com estatuto da Federação Internacional de Diabetes (IDF): (a) Circunferência do quadril > 88 cm; (b) triglicerídeos plasmáticos  $\geq 1,7$  mmol/L, ou sob tratamento medicamentoso; (c) HDL-C < 1,3 mmol/L, ou sob tratamento medicamentoso; (d) pressão arterial  $\geq 130/85$  mmHg; (e) glicose de jejum  $\geq 5,55$  mmol/L, ou sob tratamento medicamentoso (Consenso mundial de definição da Síndrome Metabólica (IDF) disponível em: <http://www.idf.org>, acessado: 11/09/2012). Todas as participantes foram informadas sobre os procedimentos do estudo e assinaram o termo de consentimento e participação que foi aprovado pelo comitê de ética institucional para pesquisas em humanos (protocolo #376/2010). Adicionalmente, todos os procedimentos experimentais foram realizados respeitando as recomendações da Declaração de Helsinki. As características gerais dos participantes são apresentadas na tabela 1.

## **Design do Estudo**

Inicialmente foram coletados os dados antropométricos, composição corporal, hemodinâmicos e realizadas duas semanas de familiarização aos exercícios. Após a familiarização, foi determinada a força máxima (teste de 1 RM) e três dias após as participantes realizaram a sessão de ER. Durante o período pré-sessão, as participantes permaneceram sentadas e em repouso e as amostras sanguíneas (10 mL) foram obtidas da veia antecubital e armazenadas em tubos padrões de Vacutainer. Em seguida, as participantes realizaram o aquecimento geral de 5 minutos de caminhada na esteira (Johnson, Landmark Drive, Cottage Grove, USA) e específico ao ER. O protocolo de ER consistiu de sete exercícios (descritos abaixo a sessão de ER). Imediatamente após e 1 hora após a sessão as amostras sanguíneas foram obtidas novamente da veia antecubital e armazenadas adequadamente para análise (figura 1). Para o protocolo experimental, as participantes iniciaram os exercícios às 8 horas após o café da manhã padronizado.

## **Protocolo de Exercício Resistido**

Após o aquecimento específico que consistiu de 15 repetições a 30% de 1 RM em cada equipamento, as participantes realizaram a sessão de ER constituído de sete exercícios: *leg press 45°*, cadeira extensora, cadeira flexora, supino vertical na máquina, puxador no *pulley*, desenvolvimento de ombros e 15 repetições de abdominais. A intensidade dos exercícios foi determinada individualmente em 60% de 1 RM e 10 repetições em cada série. O intervalo de 1 minuto foi adotado entre as séries e os exercícios. A duração total da sessão de exercícios foi de aproximadamente 40 – 50 minutos. As participantes foram instruídas a realizar cada repetição em velocidade moderada (2 segundos para o movimento completo). A ordem dos exercícios foi a mesma para todos as participantes desde a familiarização até a sessão de ER. Com objetivo de minimizar os efeitos das variações circadianas, todos os testes foram realizados entre às 8 e 10 horas da manhã. Todas as sessões foram supervisionadas por um profissional experiente em ER. A prescrição da sessão foi individualizada e apropriada para pacientes destreinados e com Síndrome Metabólica (Kraemer, Adams *et al.*, 2002; Sundell, 2011).

### **Avaliações antropométrica, da composição corporal e hemodinâmica**

A estatura e massa corporal foram medidas para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC). Todas as medidas de circunferência foram obtidas em triplicata com uma fita não-elástica e a média aritmética foi utilizada. A circunferência do pescoço foi obtida com a participante sentada e com a cabeça no plano horizontal (Yang, Yuan *et al.*, 2010). A circunferência da cintura foi medida no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (Yang, Yuan *et al.*, 2010). O Índice de Adiposidade Corporal foi determinado pela fórmula (Bergman, Stefanovski *et al.*, 2011):

$$(\text{IAC} = [(\text{circunferência do quadril}) / ((\text{estatura}) \times 1,5) - 18])$$

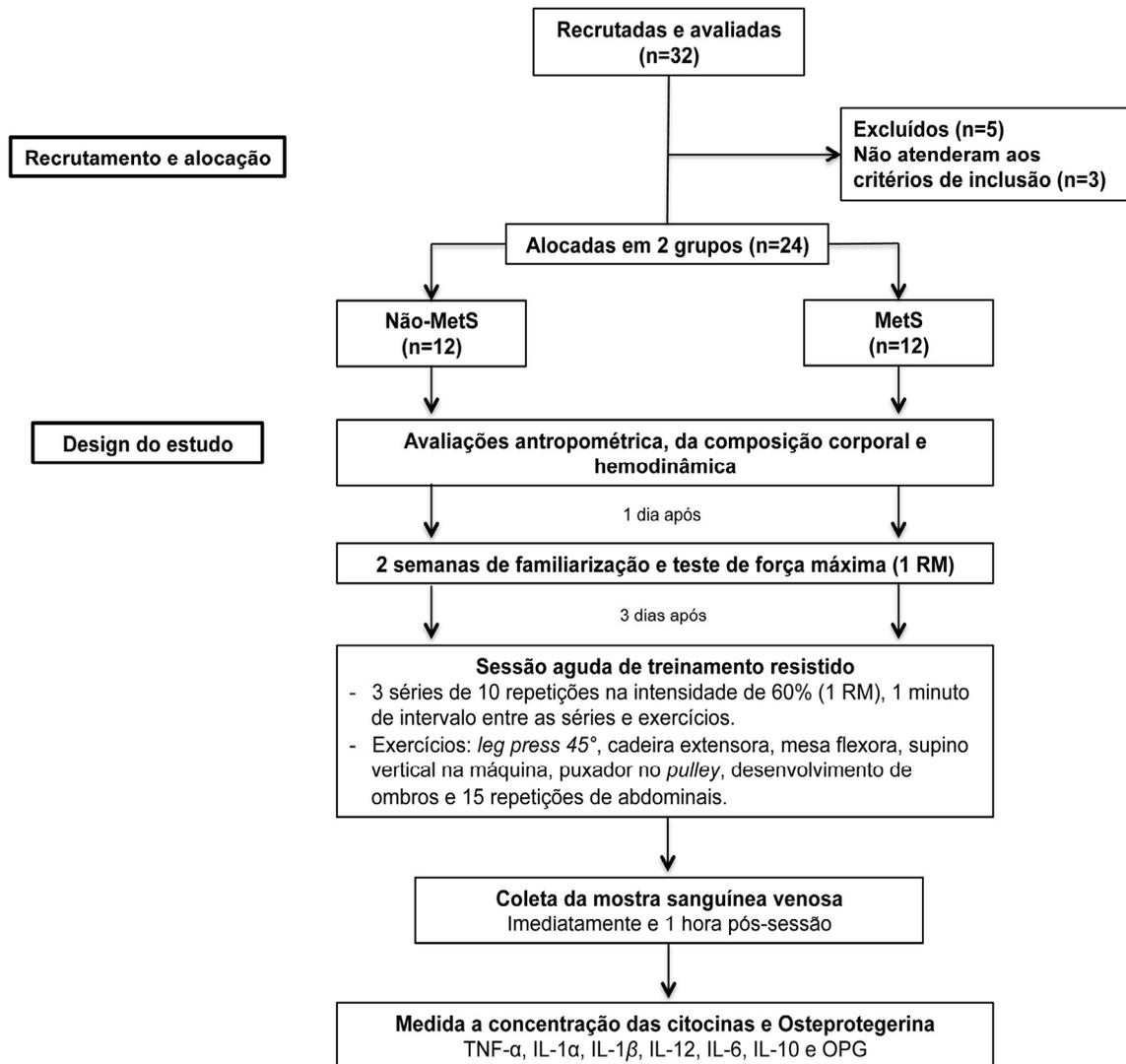


Figura 1. Seleção das participantes e design do estudo. Não-MetS, grupo de participantes sem o diagnóstico de Síndrome Metabólica; MetS, grupo de participantes com o diagnóstico clínico de Síndrome Metabólica. OPG, osteoprotegerina.

O percentual de gordura corporal foi determinado pelo protocolo de sete dobras cutâneas proposto por Pollock e Jackson (1984) (Pollock e Jackson, 1984). As dobras cutâneas foram mensuradas nas regiões: subescapular, tríceps, bíceps, peitoral, abdômen, supra-ílica e perna com adipômetro Lange (Beta Technology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Três medidas foram realizadas em cada dobra e a média aritmética utilizada para o cálculo da composição corporal.

A Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Diastólica (PAD) foram mensuradas por método oscilométrico (Microlife 3AC1-1, Widnau, Switzerland). A pressão arterial foi avaliada em triplicata (cada medida separada por 5 minutos) com a média aritmética utilizada nas análises. A Frequência Cardíaca (FC) foi medida por monitor cardíaco Polar (Polar® S810i, Polar Electro Oy, Kempele, Finland).

## Familiarização e Teste de Força Máxima

Durante as duas semanas de familiarização as participantes foram orientadas quanto à execução adequada dos exercícios. As participantes completaram 3 sessões/semana, com um exercício para cada grupo muscular consistindo de 3 séries de 10 – 12 repetições submáximas.

Após as duas semanas de familiarização dos exercícios, os testes de 1 RM foram realizados em quatro dias separados por no mínimo 48 horas. Todos os testes foram realizados com no mínimo 10 minutos de intervalo entre cada exercício. A ordem dos exercícios foi: supino vertical na máquina, puxador no *pulley* e desenvolvimento (dias 1 e 2); *leg press* 45°, cadeira extensora e cadeira flexora (dias 3 e 4) (JONHSON, USA).

O teste de 1 RM consistiu de um leve aquecimento de 10 minutos na esteira seguido de 8 repetições a 50% de 1 RM estimado (de acordo com a capacidade individual verificada nas 2 semanas de familiarização). Após 1 minuto de recuperação, as participantes realizaram 3 repetições com a intensidade de 70% de 1 RM estimado. Após 3 minutos de recuperação, as participantes completaram 3 a 5 tentativas para determinar o peso para 1 RM, com aumento progressivo de aproximadamente 5% na intensidade até a determinação de 1 RM. A execução do teste de 1 RM, amplitude de movimento e técnica de execução do movimento foram padronizadas de acordo com as descrições de Brown e Weir (2001) (Brown, 2001). Após 48 horas todos os testes foram repetidos para a determinação da correlação intraclasse (supino vertical na máquina,  $R = 0,99$ ; puxador no *pulley*,  $R = 0,97$ ; desenvolvimento de ombros,  $R = 0,98$ ; *leg press* 45°,  $R = 0,97$ ; cadeira extensora,  $R = 0,98$ ; e cadeira flexora,  $R = 0,98$ ).

## Análise das Citocinas

Após a coleta sanguínea, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g durante 15 minutos. A parte sérica foi separada e congelada a - 80°C para análise futura. O soro foi analisado para amiloide A com o analisador químico clínico DADE

Dimension RXL (Dade-[Behring](#), Inc, Newark, DE, USA) (Haugen, Norheim *et al.*). O analisador foi calibrado diariamente utilizando o kit líquido multiquil (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) e dois níveis de controle de qualidade com concentrações conhecidas foram realizadas. Em seguida, as concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 e OPG foram determinadas utilizando o kit de imunabsorbância comercial disponível (ELISA) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA; EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, USA). As curvas padrões foram geradas utilizando um leitor de microplacas compatível com software estatístico (MicroWin 2000, Microtek Laborsysteme GmbH, Overath, Germany). Todas as amostras foram analisadas em duplicata para assegurar a precisão dos resultados. O coeficiente de variação intra-análise foi de 2,9 – 9,5%, o coeficiente de variação inter-análise foi de 5,9 – 7,0% e a sensibilidade de 0,0093 pg · ml<sup>-1</sup>.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O poder do tamanho da amostra foi determinado utilizando o software G\*Power (version 3.1.3, Kiel, Germany) baseado na magnitude da média das diferenças das citocinas entre os grupos (Não-MetS e MetS). O *effect size* requerido para o tamanho da amostra foi de 24 participantes com o nível de significância ajustado a  $p = 0,05$  e *power* ( $1 - \beta$ ) = 0,80 foi de 0,60 (*effect size* médio). Somente TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  encontraram o *effect size* requerido. As variáveis IL-12, IL-1 $\alpha$ , IL-10 e OPG não demonstraram o *effect size* requerido para este estudo. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, ou média e intervalo de confiança de 95% quando apropriado. Para a análise estatística das variáveis antropométricas, bioquímicas, hemodinâmicas e níveis basais de citocinas foram testadas ou transformadas logaritmicamente para obtenção da distribuição normal (Shapiro Wilk,  $p > 0,05$ ). Foi utilizado o Teste t de *Student* para as amostras independentes ao comparar os grupos nas variáveis antropométricas, hemodinâmicas e medidas dos níveis basais das citocinas pró e anti-inflamatórias. O teste Exato de *Fisher* foi utilizado para identificar a significância de mudança nos níveis de citocinas pós-exercício e pós60-exercício entre os grupos Não-MetS e MetS. Portanto, os valores

das citocinas e OPG foram categorizados em “aumento”, “diminuição” e “sem mudança” em relação aos níveis basais. Os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o software SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta as características gerais dos dois grupos. Como resultado do desenho do estudo, o grupo MetS foi classificado como sobrepeso e obeso demonstrando valores maiores para o IMC, BAI, circunferências de pescoço, cintura e quadril, relação cintura-quadril e cintura-estatura comparado ao grupo Não-MetS grupo (tabela 1). Além disso, o grupo MetS possui valores maiores para glicose e menores para HDL comparado ao Não-MetS grupo (tabela 1). Os parâmetros hemodinâmicos como PAS, PAD e FC estão dentro das faixas normais para os dois grupos.

Tabela 1. Características antropométricas, composição corporal, bioquímicas e hemodinâmicas dos participantes (n=24).

	<b>Não-MetS</b>	<b>MetS</b>	<b>p</b>
<b><i>Parâmetros antropométricos</i></b>			
Idade (anos)	34 ± 6,8	35 ± 8,4	0,813
Massa corporal (kg)	60,9 ± 6,6	77,7 ± 11,7*	0,000
Estatura (m)	1,57 ± 0,05	1,59 ± 0,06	0,448
Circunferência do pescoço (cm)	32,7 ± 1,7	35,4 ± 1,2*	0,000
Circunferência da cintura (cm)	77,8 ± 6,3	91,5 ± 9,6*	0,000
Circunferência do quadril (cm)	99,3 ± 5,7	109,1 ± 8,5*	0,003
Relação cintura-quadril	0,78 ± 0,04	0,84 ± 0,07*	0,036
Relação cintura-estatura	0,49 ± 0,04	0,58 ± 0,07*	0,001
<b><i>Parâmetros da composição corporal</i></b>			
Índice de massa corporal (kg/m <sup>2</sup> )	24,4 ± 2,2	30,4 ± 3,9*	0,000
Índice de adiposidade corporal	14,8 ± 2,5	20,2 ± 3,9*	0,001

	<b>Não-MetS</b>	<b>MetS</b>	<b>p</b>
(%)			
Gordura corporal (%)	29,3 ± 3,7	36,3 ± 3,9*	0,000
Massa de gordura corporal (kg)	17,0 ± 5,6	28,5 ± 3,0*	0,000
Massa magra corporal (kg)	40,5 ± 2,9	49,2 ± 5,9*	0,000
<b>Parâmetros Bioquímicos</b>			
Glicose sanguínea (mg/dL)	83,0 ± 8,5	97,8 ± 20,4*	0,020
Triglicerídeos (mg/dL)	73,4 ± 25,1	158,2 ± 49,2	0,370
HDL-C (mg/dL)	54,5 ± 12,1	45,0 ± 10,0*	0,010
<b>Parâmetros hemodinâmicos</b>			
Pressão arterial sistólica (mmHg)	111,0 ± 9,6	127,6 ± 14,6*	0,004
Pressão arterial diastólica (mmHg)	74,8 ± 6,6	82,5 ± 10,0*	0,039
Frequência cardíaca (bpm)	81,5 ± 12,4	82,6 ± 17,1	0,861

\*Significativamente diferente ao grupo Não-MetS.

Os níveis séricos basais, imediatamente após e 60 minutos após a sessão das citocinas e OPG são apresentados na tabela 2. No basal, o grupo MetS apresentou concentrações maiores de IL-1 $\beta$  ( $t(11) = -2,627$ ,  $p = 0,024$ ), IL-6 ( $t(21) = -1,992$ ,  $p = 0,049$ ) e tendência a maiores níveis de TNF- $\alpha$  ( $t(22) = -1,763$ ,  $p = 0,092$ ). Não foram observadas diferenças basais significativas para os níveis de IL-1 $\alpha$ , IL-12, IL-10 e OPG entre os grupos (tabela 2). Além disso, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos para os níveis de citocinas e OPG imediatamente após e 60 minutos após a sessão.

Tabela 2. Níveis séricos de TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10 e OPG nos momentos basal (pré-exercício), imediatamente após (pós-exercício) e 60 minutos após (pós60-exercício) a sessão de exercício.

	pré-exercício		pós-exercício		pós60-exercício	
	Não-MetS	MetS	Não -MetS	MetS	Não -MetS	MetS
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg / mL)</b>	11,5 (8,2 – 14,9)	17,4 (10,9 – 23,9)	14,6 (12,4 – 16,9)	19,3 (11,2 – 27,4)	16,4 (9,6 – 23,2)	14,8 (10,9 – 18,6)
<b>IL-1<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	1,4 (0,1 – 2,9)	1,6 (0,6 – 2,6)	1,2 (0,3 – 2,8)	2,2 (0,7 – 3,7)	1,6 (0,0 – 3,1)	2,7 (0,0 – 5,4)
<b>IL-1<math>\beta</math> (pg/mL)</b>	0,8 (0,4 – 1,1)	2,1 (1,0 – 3,1) *	1,1 (0,7 – 1,4)	2,6 (1,4 – 3,8)	1,2 (0,6 – 1,8)	2,8 (1,6 – 3,9)
<b>IL-12 (pg/mL)</b>	2,1 (1,3 – 2,9)	2,5 (1,3 – 3,7)	2,4 (1,7 – 3,2)	2,8 (1,6 – 3,9)	2,8 (1,2 – 4,4)	2,4 (1,3 – 3,5)
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	4,5 (3,4 – 5,5)	6,3 (4,5 – 8,1) *	5,1 (4,1 – 6,3)	7,8 (4,6 – 11,0)	6,1 (4,5 – 7,8)	7,0 (3,7 – 10,2)
<b>IL-10 (pg/mL)</b>	12,3 (8,3 – 16,3)	12,3 (8,6 – 16,1)	11,4 (10,2 – 12,6)	14,8 (9,4 – 20,3)	11,0 (6,8 – 15,2)	13,2 (7,8 – 18,6)
<b>OPG (ng/mL)</b>	0,9 (0,7 – 1,1)	1,0 (0,8 – 1,1)	1,0 (0,8 – 1,1)	0,9 (0,7 – 1,1)	0,9 (0,7 – 1,0)	0,9 (0,7 – 1,1)

Table 2. Valores são expressos como média e intervalo de confiança de 95%. \*significativamente diferente do grupo Não-MetS.

Na ausência de mudanças significativas detectadas pelo teste *t* de *Student*, o teste Exato de *Fisher* foi utilizado para explorar a mudança nos níveis de citocinas pós-exercício e pós60-exercício entre os grupos (Não-MetS e MetS). A tabela 3 exhibe os resultados do teste Exato de *Fisher* comparando a mudança nos níveis de citocinas e OPG entre os grupos. Foi observado que 83,3% do grupo Não-MetS aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  pós-exercício enquanto que 58,3% do grupo MetS demonstraram redução ou nenhuma mudança nos níveis de TNF- $\alpha$  pós-exercício. Dessa forma, há tendência de aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em mulheres sem a Síndrome Metabólica, enquanto que mulheres com Síndrome Metabólica diminuem ou não alteram os níveis de TNF- $\alpha$  ( $p = 0,089$ ). Ademais, foi observado que 72,7% das mulheres com Síndrome Metabólica continuam apresentando diminuição nos níveis de TNF- $\alpha$  pós60-exercício, o que não foi observado nas mulheres sem Síndrome Metabólica. O grupo Não-MetS demonstrou aumento de 50% nos níveis de IL-1 $\beta$  pós-exercício, enquanto que o grupo MetS demonstrou diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$  no mesmo período. Porém, quando comparado aos valores pré-exercício, houve tendência ( $p = 0,145$ ) de diminuição das concentrações de IL-1 $\beta$  em 62,5% das pacientes do grupo MetS, enquanto que o grupo Não-MetS foi observado aumento de 80% pós60-exercício (tabela 3).

A maioria das participantes do grupo Não-MetS (75%) demonstrou aumento nos níveis de IL-6 pós60-exercício, enquanto que 54,4% do grupo MetS apresentou diminuição pós-exercício (tabela 3). Os grupos Não-MetS e MetS exibiram tendência em aumentar os níveis de IL-12 somente pós60-exercício ( $p = 0,117$ ). A maioria do grupo MetS demonstrou aumento nos níveis de IL-1 $\alpha$  pós-exercício (62,5%) seguido de diminuição ou nenhuma alteração pós60-exercício (87,5%), sem diferenças significantes quando comparado ao grupo Não-MetS ( $p = 1,000$  e  $p = 0,545$ ). Os níveis de IL-10 tendem a aumentar ou não alterarem em 70% do grupo MetS e diminuir ou não alterarem em 71,4% do grupo Não-MetS pós-exercício ( $p = 0,315$ ). Após a sessão de ER, os dois grupos, Não-MetS (85,7%) e MetS (88,9%), demonstraram aumento nos níveis de IL-12 pós60-exercício. As mudanças nos níveis de OPG entre os momentos pré, pós-exercício e pós60-exercício demonstraram uma grande variação nos dois grupos. Quando comparado ao pós-exercício, os níveis de OPG pós60-exercício demonstram pequena redução não significativa ou nenhuma alteração em 72,7% do grupo Não-MetS e 58,3% no grupo MetS ( $p = 0,659$ ; tabela 3).

Tabela 3. Comparação da alteração das citocinas nos participantes com Síndrome Metabólica (MetS) e sem Síndrome Metabólica (Não-MetS).

	pré para pós-exercício			pré para pós60-exercício			pós- para pós60-exercício		
	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	Valor de <i>p</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>			0,089			0,414			0,400
Sem mudança	-	1 (8,3)		-	-		-	-	
Aumento	10 (83,3)	5 (41,7)		8 (66,7)	5 (41,7)		6 (50,0)	3 (27,3)	
Diminuição	2 (16,7)	6 (50,0)		4 (33,3)	7 (58,3)		6 (50,0)	8 (72,7)	
<b>IL-12</b>			0,670			0,117			1,000
Sem mudança	1 (9,1)	-		2 (20,0)	-		3 (30,0)	2 (18,2)	
Aumento	5 (45,5)	7 (63,3)		7 (70,0)	6 (54,5)		4 (40,0)	4 (36,4)	
Diminuição	5 (45,5)	4 (36,4)		1 (10,0)	5 (45,5)		3 (30,0)	5 (45,5)	
<b>IL-6</b>			0,659			0,214			0,192
Sem mudança	2 (16,7)	-		-	-		-	1 (9,1)	
Aumento	7 (58,3)	6 (54,5)		9 (75,0)	5 (45,5)		9 (75,0)	4 (36,4)	

Tabela 3. Comparação da alteração das citocinas nos participantes com Síndrome Metabólica (MetS) e sem Síndrome Metabólica (Não-MetS).

	pré para pós-exercício			pré para pós60-exercício			pós- para pós60-exercício		
	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	Valor de <i>p</i>
Diminuição	3 (25,0)	5 (45,5)		3 (25,0)	6 (54,4)		3 (25,0)	6 (54,5)	
<b>IL-10</b>			0,315			1,000			1,000
Sem mudança	1 (14,3)	1 (10,0)		1 (14,3)	-		-	-	
Aumento	2 (28,6)	6 (60,0)		2 (28,6)	3 (33,3)		6 (85,7)	8 (88,9)	
Diminuição	4 (57,1)	3 (30,0)		4 (57,1)	6 (66,7)		1 (14,3)	1 (11,1)	
<b>IL-1<math>\alpha</math></b>			1,000			0,558			0,545
Sem mudança	-	-		-	-		-	2 (25,0)	
Aumento	3 (50,0)	5 (62,5)		2 (40,0)	5 (71,4)		2 (40,0)	1 (12,5)	
Diminuição	3 (50,0)	3 (37,5)		3 (60,0)	2 (28,6)		3 (60,0)	5 (62,5)	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>			1,000			0,145			0,633
Sem mudança	-	-		-	-		1 (10,0)	1 (12,5)	
Aumento	6 (54,5)	5 (50,0)		8 (80,0)	3 (37,5)		4 (40,0)	2 (25,0)	

Tabela 3. Comparação da alteração das citocinas nos participantes com Síndrome Metabólica (MetS) e sem Síndrome Metabólica (Não-MetS).

	pré para pós-exercício			pré para pós60-exercício			pós- para pós60-exercício		
	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	<i>p</i> value	Não-MetS	MetS	Valor de <i>p</i>
Diminuição	5 (45,5)	5 (50,0)		2 (20,0)	5 (62,5)		5 (50,0)	5 (62,5)	
<b>OPG</b>			1,000			1,000			0,659
Sem mudança	-	1 (9,1)		-	-		-	1 (8,3)	
Aumento	6 (54,5)	5 (45,5)		5 (41,7)	6 (50,0)		3 (27,3)	5 (41,7)	
Diminuição	5 (45,5)	5 (45,5)		7 (58,3)	6 (50,0)		8 (72,7)	6 (50,0)	

*p* valor de *p* obtido pelo teste Exato de *Fisher*. Os valores dentro dos parênteses exibem o percentual de alteração nos participantes.

## DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi examinar os efeitos agudos de uma sessão de ER nos níveis séricos de citocinas e OPG em mulheres com e sem Síndrome Metabólica. Nesse sentido, nossa hipótese foi parcialmente confirmada, uma vez que as participantes com Síndrome Metabólica exibiram níveis basais mais elevados de IL-1 $\beta$  e IL-6 comparado com as participantes sem Síndrome Metabólica. Porém, não foram observadas alterações significativas em nenhum dos momentos (imediatamente e 60 minutos) após a sessão de ER nas concentrações de citocinas e OPG nos grupos. Ademais, pacientes com Síndrome Metabólica demonstraram tendência de maior valor basal para o TNF- $\alpha$  maior do que as participantes sem Síndrome Metabólica.

No presente estudo, as participantes com Síndrome Metabólica exibiram aumento nos valores basais de IL-1 $\beta$  e IL-6. A IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas pró-inflamatórias sintetizadas por monócitos e macrófagos. Adicionalmente, foi demonstrado que a expressão de IL-1 $\beta$  é maior no tecido adiposo visceral de mulheres com obesidade e Síndrome Metabólica (Shen, Arnett *et al.*, 2007). Além disso, em pacientes obesos há uma forte correlação entre obesidade e os níveis de IL-6. A IL-6 é um forte estímulo para a expressão da proteína C-reativa, sendo sugerido que níveis elevados de proteína C-reativa são secundários ao aumento na secreção de IL-6. Igualmente, níveis elevados de IL-6 são observados em indivíduos com doença cardiovascular e são associados a eventos isquêmicos futuros. Foi demonstrado que injeções semanais de IL-6 recombinante em camundongos C57B1/6 e deficientes de ApoE aumentaram significativamente as concentrações de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , fibrinogênio e o desenvolvimento de aterosclerose comparado aos controles (Huber Sa, 1999). Essas informações prévias em conjunto nos permitem acreditar que citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda, como IL-6, IL-1 $\beta$  e proteína C-reativa, participam do desenvolvimento e progressão da Síndrome Metabólica.

Neste estudo, não observamos diferenças significativas para os níveis basais de TNF- $\alpha$  entre os grupos MetS e Não-MetS (17,4 *versus* 11,5 pg/mL, respectivamente), ainda que podemos considerar uma tendência de maiores valores

dos níveis de TNF- $\alpha$  no grupo MetS comparado ao Não-MetS ( $p = 0,09$ ). Similar aos nossos resultados, estudos prévios não demonstraram diferenças estatísticas significantes para os níveis de TNF- $\alpha$  entre pacientes obesos e com Síndrome Metabólica (You, Ryan *et al.*, 2004; Gnacinska, Malgorzewicz *et al.*, 2010). Em contrapartida, outros estudos observaram níveis elevados desta citocina em pacientes com Síndrome Metabólica somente quando o critério do “*Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*” (NCEP ATP III) foi utilizado clinicamente e laboratorialmente para definir a Síndrome Metabólica (e não de acordo com critério IDF) (Xydakis, Case *et al.*, 2004). Provavelmente a variação na definição da obesidade central utilizando o critério IDF seja o principal motivo para explicar as diferenças observadas na mensuração dos marcadores inflamatórios em nosso estudo. De acordo com a definição proposta pelo critério IDF, é necessário um ponto de corte inferior para definir os pacientes com obesidade central comparado ao critério NCEP ATP III. Ademais, o IDF requer também a obesidade central como um pré-requisito para a determinação da Síndrome Metabólica.

O ajuste metabólico e os processos de reparo celular iniciados agudamente por uma sessão de exercício são mais evidentes nas primeiras semanas e podem refletir alguns parâmetros do treinamento crônico. Neste sentido, as citocinas desempenham um papel central por iniciar as respostas metabólicas e inflamatórias tanto na perspectiva aguda e como na crônica ao exercício físico. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas nas citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-12) e anti-inflamatória (IL-10) após a sessão aguda de ER quando comparado às interações grupo (MetS e Não-MetS) e tempo (pré, pós-exercício e pós60-exercício). Estes resultados estão de acordo com Buford *et al.* (2009) os quais examinaram os efeitos agudos do ER nas concentrações séricas de citocinas em mulheres pós-menopáusicas saudáveis e não observaram diferenças estatisticamente significativas para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 nos momentos 3, 24 e 48 horas após o exercício físico (Buford, Cooke *et al.*, 2009). Contudo, no teste Exato de Fisher demonstramos tendência de redução em 62,5% na IL-1 $\beta$ , 54,4% na IL-6 e 72,7% no TNF- $\alpha$  nas participantes com Síndrome Metabólica após 60 minutos da sessão. Em contrapartida, as participantes sem Síndrome Metabólica exibiram aumento de 80% na IL-1 $\beta$ , 75% na IL-6 e 83,3% no TNF- $\alpha$  após 60 minutos da sessão.

Ferreira et al. (2010) também investigaram os efeitos agudos de uma sessão de ER sobre os níveis séricos de citocinas em mulheres de meia-idade (Ferreira, De Medeiros *et al.*, 2010). Novamente, não foi observado alterações nos níveis séricos de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10 após a sessão de ER. Ademais, Prestes et al. (2009) avaliaram os efeitos agudos de uma sessão de ER e não encontraram nenhuma diferença significativa nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, leptina e resistina imediatamente após o exercício em mulheres pós-menopáusicas (Prestes, Shiguemoto *et al.*, 2009). Diferente do presente estudo, os estudos mencionados anteriormente não avaliaram participantes com Síndrome Metabólica e prescreveram a sessão com repetições máximas em cada série e exercício (falha concêntrica), o qual pode não ser a melhor estratégia para participantes destreinados ao ER e com Síndrome Metabólica (considerando as alterações metabólicas nesta população). Além disso, estudos prévios com participantes do sexo masculino não demonstraram mudança ou resultados controversos após uma sessão de ER nos valores de citocinas (Smith, Anwar *et al.*, 2000; Hirose, Nosaka *et al.*, 2004; Peake, Nosaka *et al.*, 2006; Pierdomenico e Cuccurullo, 2010).

Os estudos mencionados anteriormente apresentam uma grande variação de protocolos, intensidade do exercício e grupos musculares envolvidos, e demonstram inconsistência em observar alterações significativas nas citocinas mensuradas imediatamente e/ou nas primeiras horas após a sessão de exercício. As possíveis explicações podem ser relacionadas a vários fatores. Primeiro, os estoques de glicogênio muscular oferecem energia durante a sessão de ER. No entanto, em indivíduos com sobrepeso e obesidade a depleção do glicogênio muscular pode estar reduzida durante o exercício, a qual pode afetar diretamente a produção de IL-6. Neste sentido, os efeitos modulatórios da IL-6 sobre a produção de TNF- $\alpha$  e citocinas anti-inflamatórias como IL-1ra e IL-10 podem ser suprimidos (Steensberg, Van Hall *et al.*, 2000). Segundo, tem sido demonstrado que a contração muscular pode estimular a síntese e secreção de IL-6, e conseqüentemente aumentar sua concentração plasmática. Buford et al. (2009) demonstraram que o músculo esquelético possui fatores transcricionais disponíveis de genes pró-inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-8) 3 h após uma sessão de ER (Buford, Cooke *et al.*, 2009). Ademais, foi observado que o tempo para os picos de IL-6 após protocolos de ER foram próximos a 3, 6, 12 h ou até mesmo 24 h (Macintyre, Sorichter *et al.*, 2001; Peake, Nosaka *et al.*, 2006; Phillips, Mitchell *et al.*, 2010). Terceiro, a resposta das

citocinas pode variar de acordo com o tipo de ER, intensidade, duração, período de recuperação entre os exercícios e nível de treinamento do praticante. Tais fatores podem modificar a resposta dos hormônios estressantes, acidose e estresse oxidativo. Finalmente, a especificidade e sensibilidade dos métodos de análise das citocinas utilizados e os fatores previamente discutidos podem ajudar a explicar a grande variação nos resultados.

Os níveis de OPG são diretamente associados com a massa óssea e alguns componentes da Síndrome Metabólica, como disfunção endotelial, hipertensão e aterosclerose. O presente estudo foi o primeiro a investigar as alterações imediatas na concentração sérica de OPG após uma sessão de ER em mulheres com e sem Síndrome Metabólica. Os resultados demonstram nenhuma interação (tempo x grupo) nos níveis de OPG nos dois grupos. Ainda não há estudos metodologicamente adequados e conclusivos demonstrando a existência da clara ligação entre obesidade, perfil lipídico, Síndrome Metabólica e níveis de OPG (Nabipour, Kalantarhormozi *et al.*, 2010; Blazquez-Medela, Lopez-Novoa *et al.*, 2011). Em relação aos efeitos do exercício, estudos prévios demonstram aumento nas concentrações de OPG imediatamente após corrida exaustiva (Ziegler, Niessner *et al.*, 2005; Kerschman-Schindl, Thalmann *et al.*, 2009; Scott, Sale *et al.*, 2010). Além disso, níveis circulatórios aumentados de OPG são observados em condições de significativa perda de massa óssea. Entretanto, sem a análise do receptor ativador do fator nuclear - kappaB (RANK), RANK ligando (RANKL) e OPG com métodos sensíveis de análises, qualquer interpretação sobre a associação entre OPG, remodelamento ósseo e ER é incompleta e precoce (Yano, Tsuda *et al.*, 1999; Scott, Sale *et al.*, 2010).

A progressão do programa de ER é dependente do desenvolvimento dos objetivos apropriados e específicos do treinamento. A maioria dos estudos previamente publicados empregam uma grande variação de protocolos de exercício, diferentes grupos musculares e intensidades, os quais não necessariamente correspondem à prescrição utilizada diariamente em academias e clínicas de reabilitação para pacientes com Síndrome Metabólica (Hirose, Nosaka *et al.*, 2004; Peake, Nosaka *et al.*, 2006; Bloomer, 2007; Buford, Cooke *et al.*, 2009; Uchida, Nosaka *et al.*, 2009; Calle e Fernandez, 2010). No presente estudo, a prescrição do programa de ER seguiu as recomendações do ACSM (2009), com correta técnica de execução e equipamentos apropriados para a segurança e efetividade do ER para

esta população (Kraemer, Adams *et al.*, 2002; American College of Sports, 2009; Sundell, 2011). Os resultados desse estudo sugerem que uma sessão aguda de ER de intensidade moderada não induz aumento dramático em citocinas pró-inflamatórias em mulheres com Síndrome Metabólica. Em adição, o teste de Exato de Fisher e o intervalo de confiança permitiram uma interpretação mais detalhada e completa dos efeitos agudos da sessão de ER (Morton, 2009). O presente estudo possui algumas limitações que devem ser consideradas, como o número reduzido de participantes e o conseqüente baixo poder da amostra em algumas variáveis analisadas, a carência de mais pontos de análise e a medida de outras citocinas e proteínas de fase aguda. Ademais, as respostas crônicas ao ER devem ser investigadas com o objetivo de elucidar e fortalecer cientificamente o efeito positivo do exercício físico na prevenção e tratamento da Síndrome Metabólica.

Em conclusão, uma sessão de ER não promove aumento sistêmico agudo da resposta de OPG, citocinas pró- (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10) imediatamente após e 60 minutos após a sessão em mulheres com Síndrome Metabólica. Estes resultados contribuem para aumentar o entendimento, importância e segurança do ER submáximo em mulheres com Síndrome Metabólica.

### AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro fornecido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil.

### REFERÊNCIAS

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS, M. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009. ISSN 1530-0315 (Electronic) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204579> >.

BEAVERS, K. M.; BRINKLEY, T. E.; NICKLAS, B. J. Effect of exercise training on chronic inflammation. **Clin Chim Acta**, v. 411, n. 11-12, p. 785-93, Jun 3 2010. ISSN

1873-3492 (Electronic) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188719> >.

BERGMAN, R. N. et al. A better index of body adiposity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 5, p. 1083-9, May 2011. ISSN 1930-7381 (Print) 1930-7381 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21372804> >.

BLAZQUEZ-MEDELA, A. M.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; MARTINEZ-SALGADO, C. Osteoprotegerin and diabetes-associated pathologies. **Curr Mol Med**, v. 11, n. 5, p. 401-16, Jul 1 2011. ISSN 1875-5666 (Electronic) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21568931> >.

BLOOMER, R. J. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. **Sports Med**, v. 37, n. 6, p. 519-32, 2007. ISSN 0112-1642 (Print) 0112-1642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503877> >.

BRANDT, C.; PEDERSEN, B. K. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 520258, 2010. ISSN 1110-7251 (Electronic) 1110-7243 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224659> >.

BROWN, L., WEIR, JP. Accurate Assessment of Strength and Power, Methods. **Journal of Exercise Physiologyonline**, v. 4, n. 3, 2001. ISSN 1097-9751.

BUFORD, T. W.; COOKE, M. B.; WILLOUGHBY, D. S. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 107, n. 4, p. 463-71, Nov 2009. ISSN 1439-6327 (Electronic) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19669788> >.

CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Effects of resistance training on the inflammatory response. **Nutr Res Pract**, v. 4, n. 4, p. 259-69, Aug 2010. ISSN 2005-6168 (Electronic) 1976-1457 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20827340> >.

CATENACCI, V. A.; HILL, J. O.; WYATT, H. R. The obesity epidemic. **Clin Chest Med**, v. 30, n. 3, p. 415-44, vii, Sep 2009. ISSN 1557-8216 (Electronic) 0272-5231 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700042> >.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-147, Mar 15 1996. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8630372> >.

FERREIRA, F. C. et al. Circuit resistance training in sedentary women: body composition and serum cytokine levels. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 35, n. 2, p. 163-71, Apr 2010. ISSN 1715-5312 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383226> >.

FESTA, A. et al. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation**, v. 102, n. 1, p. 42-7, Jul 4 2000. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880413> >.

GANNAGE-YARED, M. H. et al. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 64, n. 6, p. 652-8, Jun 2006. ISSN 0300-0664 (Print) 0300-0664 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712667> >.

GNACINSKA, M. et al. The serum profile of adipokines in overweight patients with metabolic syndrome. **Endokrynol Pol**, v. 61, n. 1, p. 36-41, Jan-Feb 2010. ISSN 0423-104X (Print) 0423-104X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205102> >.

GOLLEDGE, J. et al. Determinants of endothelial function in a cohort of patients with peripheral artery disease. **Cardiology**, v. 111, n. 1, p. 51-6, 2008. ISSN 1421-9751 (Electronic) 0008-6312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18239393> >.

GUH, D. P. et al. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, v. 9, p. 88, 2009. ISSN 1471-2458 (Electronic) 1471-2458 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320986> >.

HAUGEN, F. et al. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 4, p. C807-16, Apr 2010. ISSN 1522-1563 (Electronic) 0363-6143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089933> >.

HIROSE, L. et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. **Exerc Immunol Rev**, v. 10, p. 75-90, 2004. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15633588> >.

HUBER SA, S. P., CONZA D, HARDIN N, TRACY R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 19, p. 2364-2367, 1999.

IZQUIERDO, M. et al. Cytokine and hormone responses to resistance training. **Eur J Appl Physiol**, v. 107, n. 4, p. 397-409, Nov 2009. ISSN 1439-6327 (Electronic) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19649649> >.

KERSCHAN-SCHINDL, K. et al. A 246-km continuous running race causes significant changes in bone metabolism. **Bone**, v. 45, n. 6, p. 1079-83, Dec 2009. ISSN 1873-2763 (Electronic) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19665602> >.

KRAEMER, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 34, n. 2, p. 364-80, Feb 2002. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11828249> >.

MACINTYRE, D. L. et al. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. **Eur J Appl Physiol**, v. 84, n. 3, p. 180-6, Mar 2001. ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320633> >.

MATHUR, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. **Mediators Inflamm**, v. 2008, p. 109502, 2008. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148295> >.

MORTON, J. P. Reviewing scientific manuscripts: how much statistical knowledge should a reviewer really know? **Adv Physiol Educ**, v. 33, n. 1, p. 7-9, Mar 2009. ISSN 1522-1229 (Electronic) 1043-4046 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261753> >.

NABIPOUR, I. et al. Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 742-7, May 2010. ISSN 1532-8600 (Electronic) 0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19922962> >.

PEAKE, J. M. et al. Systemic inflammatory responses to maximal versus submaximal lengthening contractions of the elbow flexors. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 72-85, 2006. ISSN 1077-5552 (Print) 1077-5552 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17201073> >.

PHILLIPS, M. D. et al. Influence of commonly employed resistance exercise protocols on circulating IL-6 and indices of insulin sensitivity. **J Strength Cond Res**, v. 24, n. 4, p. 1091-101, Apr 2010. ISSN 1533-4287 (Electronic) 1064-8011 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20168253> >.

PIERDOMENICO, S. D.; CUCCURULLO, F. Ambulatory blood pressure monitoring in type 2 diabetes and metabolic syndrome: a review. **Blood Press Monit**, v. 15, n. 1, p. 1-7, Feb 2010. ISSN 1473-5725 (Electronic) 1359-5237 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071977> >.

POLLOCK, M. L.; JACKSON, A. S. Research progress in validation of clinical methods of assessing body composition. **Med Sci Sports Exerc**, v. 16, n. 6, p. 606-15, Dec 1984. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6392815> >.

PRESTES, J. et al. Effects of resistance training on resistin, leptin, cytokines, and muscle force in elderly post-menopausal women. **J Sports Sci**, v. 27, n. 14, p. 1607-15, Dec 2009. ISSN 1466-447X (Electronic) 0264-0414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19967592> >.

REID, P.; HOLEN, I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). **Eur J Cell Biol**, v. 88, n. 1, p. 1-17, Jan 2009. ISSN 1618-1298 (Electronic) 0171-9335 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18707795> >.

ROBBIE, L.; LIBBY, P. Inflammation and atherothrombosis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 947, p. 167-79; discussion 179-80, Dec 2001. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11795264> >.

SCOTT, J. P. et al. The effect of training status on the metabolic response of bone to an acute bout of exhaustive treadmill running. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 8, p. 3918-25, Aug 2010. ISSN 1945-7197 (Electronic) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519353> >.

SHEN, J. et al. Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. **J Nutr**, v. 137, n. 8, p. 1846-51, Aug 2007. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17634253> >.

SMITH, L. L. et al. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. **Eur J Appl Physiol**, v. 82, n. 1-2, p. 61-7, May 2000.

ISSN 1439-6319 (Print) 1439-6319 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879444> >.

STEENBERG, A. et al. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. **J Physiol**, v. 529 Pt 1, p. 237-42, Nov 15 2000. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11080265> >.

SUNDELL, J. Resistance Training Is an Effective Tool against Metabolic and Frailty Syndromes. **Adv Prev Med**, v. 2011, p. 984683, 2011. ISSN 2090-3499 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991450> >.

UCHIDA, M. C. et al. Effect of bench press exercise intensity on muscle soreness and inflammatory mediators. **J Sports Sci**, v. 27, n. 5, p. 499-507, Mar 2009. ISSN 0264-0414 (Print) 0264-0414 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253084> >.

XYDAKIS, A. M. et al. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 6, p. 2697-703, Jun 2004. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181044> >.

YANG, G. R. et al. Neck circumference positively related with central obesity, overweight, and metabolic syndrome in Chinese subjects with type 2 diabetes: Beijing Community Diabetes Study 4. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2465-7, Nov 2010. ISSN 1935-5548 (Electronic) 0149-5992 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20724650> >.

YANO, K. et al. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 14, n. 4, p. 518-27, Apr 1999. ISSN 0884-0431 (Print) 0884-0431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234572> >.

YOU, T.; RYAN, A. S.; NICKLAS, B. J. The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, n. 11, p. 5517-22, Nov 2004. ISSN 0021-972X (Print) 0021-972X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489217> >.

ZIEGLER, S. et al. Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. **Metabolism**, v. 54, n. 7, p. 935-8, Jul 2005. ISSN 0026-0495 (Print) 0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15988704> >.

## **APÊNDICE 1**

## APÊNDICE A - E-MAIL E O ARTIGO CIENTÍFICO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *CELLULAR IMMUNOLOGY*

**De:** CI <ci@elsevier.com>  
**Assunto:** CIMM-12-224R1: Final Decision  
**Data:** 2 de novembro de 2012 16:06:06 BRST  
**Para:** Guilherme Borges Pereira

Ocultar

Entrada - Gmail 

Ms. No.: CIMM-12-224R1  
Title: Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4+ and CD8+ lymphocytes  
Corresponding Author: Mr. Guilherme Borges Pereira  
Authors: Jonato Prestes, PhD.; Ramires A Tibana, M.D.; Gilberto E Shiguemoto, PhD.; James Navalta, PhD.; Sergio E Perez, PhD.

Dear Mr. Pereira,

We are pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for publication in Cellular Immunology.

Many thanks for submitting your fine paper to Cellular Immunology. We look forward to receiving additional papers from you in the future.

With kind regards,

Nora Sarvetnick  
Editor-in-Chief  
Cellular Immunology

Cellular Immunology Editorial Office  
525 B Street Suite 1900  
San Diego, CA 92101-4495, USA  
Phone: 619-699-6327  
Fax: 619-699-6859  
Email: [ci@elsevier.com](mailto:ci@elsevier.com)

For more information about Scopus and ScienceDirect, please visit [www.info.scopus.com/ees/](http://www.info.scopus.com/ees/).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Cellular Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ycimm](http://www.elsevier.com/locate/ycimm)

## Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4+ and CD8+ lymphocytes

G.B. Pereira<sup>a,\*</sup>, J. Prestes<sup>b</sup>, R.A. Tibana<sup>b</sup>, G.E. Shiguemoto<sup>a</sup>, J. Navalta<sup>c</sup>, S.E.A. Perez<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências, Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Educação, Física da Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brazil

<sup>c</sup> Department of Kinesiology and Nutrition Sciences of the University of Nevada, Las Vegas, NV, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 October 2012

Accepted 2 November 2012

Available online 27 November 2012

#### Keywords:

Immune system  
Programmed cell death  
Leukocytes  
Cell migration  
B lymphocyte  
T lymphocyte

### ABSTRACT

The purpose of the present study was to examine the acute effects of resistance training (RT) on CD4+ and CD8+ T lymphocytes apoptosis (annexin V+) and migration (CX<sub>3</sub>CR1). Twelve subjects performed two RT sessions (3 sets of 9 exercises) with 1 min (Hyper-1) and 3 min (Hyper-3) of rest-interval length between sets and exercises. CD4+ and CD8+ cells count displayed no change following Hyper-1 and Hyper-3. There was an increase in the percentage of CD4+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ immediately after and 24 h post Hyper-1. Percentage of CD4+ positive for annexin V+ increased 2 and 24 h post Hyper-3, and decreased after CXCR1+ for the same time-points. There was an increase in CD8+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ immediately after, 2 and 24 h post Hyper-1 and Hyper-3, while no differences were found between Hyper-1 and Hyper-3. Acute RT increase the apoptosis and migration of CD4+ and CD8+ lymphocytes even 24 h after exercise, with minimal effects of rest-interval length.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The response of different immune cells to exercise depends on the type, intensity, and duration [1]. In general, acute protocols elicit a known biphasic change in the total blood lymphocyte count. At the onset of exercise, there is a rapid mobilization of lymphocytes into the blood, resulting in an elevated count (lymphocytosis) [1]. In particular, lymphocyte subtypes with high cytotoxic capabilities (i.e., natural killer cells – NK cells, CD8+ T cells) seem to be highly stress responsive when compared with other subtypes (i.e., CD4+ T cells, B cells) that have a limited cytotoxic capacity and are mobilized in relatively fewer numbers. During the early stages of recovery, usually within 30 min to 2 h after exercise cessation, the blood lymphocyte count is known to fall below resting values (lymphocytopenia) and returns naturally to normal values within 6–24 h [1,2]. It is possible that a portion of this reduction in lymphocytes can be attributed to the elimination through programmed cell death (apoptosis), movement of cells from the circulation (migration), or a combination of both [3–6].

During the recovery of an exercise session blood lymphocytes are exposed to a milieu of proapoptotic signals that include increased levels of glucocorticoids, catecholamine, inflammatory

cytokines, and reactive oxygen species, which could elicit changes at the molecular level, leaving certain T-cell subsets more susceptible to both intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis and migration [1,2]. In this regard, annexin V is a member of the annexin family of intracellular proteins that binds to phosphatidylserine in a calcium-dependent manner. Phosphatidylserine is normally only found on the intracellular leaflet of the plasma membrane in healthy cells, but during early apoptosis, membrane asymmetry is lost and phosphatidylserine translocate to the external leaflet [7,8]. Hence, annexin V can then be used to specifically target and identify apoptotic cells. Additionally, lymphocytes naturally migrate to and from the lymphoid pools in an attempt to maintain the immunity pool. Thus, CX<sub>3</sub>CR1 (known as fractalkine, neurotactin) is a G-protein-coupled seven-transmembrane chemokine receptor used as a marker of cell migration, being expressed on NK cells, T cell subsets, monocytes/macrophages, dendritic cells, and some malignant epithelial cells [9,10]. The interaction of CX<sub>3</sub>CR1 and its ligand mediates cell firm adhesion and migration [9,10]. However, whether resistance training (RT) acts as a sufficient stimulus to induce apoptosis and migration in CD8+ and CD4+ T cells subset is uncertain.

Studies have been focused to elucidate the immune response primarily to aerobic and anaerobic exercise using cycle ergometry, treadmill and outdoor running, with less research conducted on the effects RT [3,11–13]. Results of leukocyte subset trafficking following RT display a large degree of inconsistency due to the wide variability on protocols [14–16]. The American College of Sports

\* Corresponding author. Address: Rodovia Washington Luís, km 235, SP-310, São Carlos, CEP 13565-905, São Paulo, Brazil. Fax: +55 016 3351 8386.

E-mail address: [guifisiologia@gmail.com](mailto:guifisiologia@gmail.com) (G.B. Pereira).

Medicine [ACSM, 2009] highlights the benefits of RT in increasing health, physical fitness, and life span [17]. Among the benefits are increases in strength, power, muscular endurance, and fat-free mass, which can be achieved by the manipulation of RT variables, such as order of exercise, number of sets, intensity and rest interval [17]. For example, Mayhew et al. [2005] demonstrated that RT with shorter rest intervals (1 min) leads to markedly greater alterations on immune cell count compared to longer rest intervals (3 min) [13]. However, they used an exercise bout consisting of 10 sets of 10 repetitions at 65% of repetition maximum (1RM) in leg press, which is not according to the ACSM [2009] recommendations [17]. Moreover, most RT studies investigated mainly variations on the immune cell count, with only one showing an alterations on cell count and increased lymphocyte apoptosis after heavy RT [4].

Kruger et al. [2011] reported that despite the wide area of application and different user groups, less is known on positive or detrimental effects of RT on immune function. Some studies that focused on these aspects were specifically designed to induce muscle damage or were performed with unusual training methodologies, which may not reflect RT under practical conditions [18]. Thus, the characterization and understanding of the immune response set for beginners may aid to the future design and dose–response prescription of RT based on additional physiological variables, rather than just neuromuscular and metabolic parameters.

Therefore, the aim of the present study was to investigate the acute effects of RT as recommended by the ACSM [2009] on CD4+ and CD8+ T cell apoptosis and migration in novice individuals. A secondary objective was to investigate the immune cell response to different rest interval lengths (1 min and 3 min). We hypothesized that CD8+ T cells might exhibit higher responsive on migration and apoptosis mainly in early exercise recovery (up to 2 h), with greater magnitudes during a shorter rest-interval.

## 2. Material and methods

### 2.1. Subjects

Twelve healthy untrained young men ( $N=3$ ) and women ( $N=9$ ) volunteered to participate. As previously shown, neither gender nor menstrual cycle phase influences exercise-induced lymphocyte apoptosis [5]. A comprehensive description of the sample power is found in the statistical analysis.

Subjects were considered novice (untrained) according to ACSM guidelines [2009], if they had no previous experience with regular RT. In addition, female subjects did not take oral contraceptives for at least 6 months before testing. Participants indicated they were not currently using medication, dietary supplements, anabolic steroids, alcohol and smoking, and were free of immune, muscular or cardiovascular diseases. The Research Ethics committee of Western Kentucky University granted approval for the study's procedures and all participants provided written informed consent (HS12-053). The study was conducted in accordance to the Declaration of Helsinki. Anthropometric, body composition and hemodynamic characteristics of subjects are presented in Table 1.

### 2.2. Study design

Each volunteer participated in eight testing sessions and were asked to refrain from strenuous physical activity during the study. Briefly, the first visit consisted of baseline anthropometric measurements and a RT familiarization session. Subjects returned 72 h later to complete the second familiarization session. Visits 3rd to 6th consisted of performing the 10-repetitions maximal

**Table 1**  
Baseline anthropometric, body composition and hemodynamic characteristics of subjects.

Anthropometric variables	Mean $\pm$ SD
Age (years)	20.7 $\pm$ 0.8
Body mass (kg)	73.9 $\pm$ 19.3
Height (m)	1.70 $\pm$ 0.07
<i>Body composition variables</i>	
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25.2 $\pm$ 5.3
Body fat (%)	15.8 $\pm$ 6.0
Fat-free mass (kg)	58.5 $\pm$ 8.9
Fat mass (kg)	11.4 $\pm$ 5.6
Seven skinfold thickness, mm	135.0 $\pm$ 57.8
<i>Hemodynamic variables</i>	
Systolic blood pressure (mmHg)	110.0 $\pm$ 7.6
Diastolic blood pressure (mmHg)	64.0 $\pm$ 6.3
Heart rate (bpm)	70.7 $\pm$ 8.7

test–retest (10RM). The exercises tested were: chest press, leg press, front lat pull-down, seated leg extension, up right row, seated leg curl, triceps extension, calf rise and biceps curl.

On the seventh and eighth experimental days, RT sessions were randomly performed with two different rest intervals (1 and 3 min) separated by 5 days. Before each RT session, subjects rested for 10 min, followed by a finger-stick blood sample (PRE) [19]. Blood samples were obtained at three additional time-points: immediately post-exercise (POST), 2 and 24 h after completion of the session. The lymphocyte subsets investigated are described in detail below.

### 2.3. Anthropometric, hemodynamic and body composition evaluations

Height was determined using a wall-mounted stadiometer, body mass was recorded using a calibrated digital scale, and percent body fat was estimated using a Lange skinfold caliper (Beta Technology Inc., Cambridge, MA) and a 7-site skinfold equation. Systolic and diastolic blood pressure were measured with a calibrated stethoscope and a sphygmomanometer.

### 2.4. Familiarization session and ten-repetitions maximal test

During the familiarization, the subjects received standardized instructions on technique and they performed one exercise for each main muscle group with 3 sets of 10–12 submaximal repetitions. After the familiarization, 10RM tests were performed for all exercises using a counterbalanced order on four separate days with a minimum of 72 h between them. The heaviest load achieved during the test was considered the 10RM. No exercise was allowed in the 72 h between tests to avoid interference in the test–retest reliability. To minimize the error during tests, the following strategies were adopted: (a) standardized instructions concerning the testing procedure were explained to each participant before the test; and (b) the mass of all weights and bars used were determined using a precision scale. The 10RM was determined in fewer than 5 attempts interspersed with a rest interval of 5 min, and 10 min was allowed before the beginning of the next testing. On each test and re-test trial, four or five exercises were tested using a counterbalanced order, alternating lower and upper limbs. All test–retest and training sessions were performed at the same time of the day. The intraclass correlation coefficient (model 1.1 one-way random single measures) revealed an optimal reliability for all exercises ( $R \geq 0.98$ ).

### 2.5. Resistance training sessions

Approximately five days after the familiarization and testing sessions, another baseline blood sample at the same time of day

was collected. This procedure guaranteed that the familiarization period did not modify the immune parameters. After a warm-up (set of 10 repetitions of chest press at 40% of 10RM), all subjects completed the first exercise bout consisting of nine RT exercises utilizing the following order: chest press, leg press, front lat pull-down, seated leg extension, up right row, seated leg curl, triceps extension, calf rise and biceps curl (Cybex International, Medway, MA, USA). For all exercises, three sets were performed at 10RM. A rest interval of 1 or 3 min was allowed between sets and exercises, and the total duration of the session was 50–80 min.

Seven days after the first RT session, subjects completed a second trial with the same protocol characteristics, with the exception of the rest interval between sets and exercises (1 or 3 min). Participants were instructed to perform each repetition at a moderate velocity (i.e., 3 s for concentric and eccentric phases, respectively). The exercise order was consistent during the entire study. Sessions were supervised by experienced strength training professional and were designed according to the ACSM guidelines [2009] for novice individuals.

### 2.6. Blood analysis

All flow cytometry antibodies and buffers were obtained from e-Bioscience (San Diego, CA, USA) unless noted otherwise. The investigated lymphocyte subsets were: CD4+, CD4+/CD69+, CD8+ and CD8+/CD69+ with cell surface markers annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1 (BioLegend, San Diego, CA, USA). The protocol of blood analysis for lymphocyte subsets has been described previously [19]. Briefly, whole blood (20  $\mu$ L) was added to an appropriate antibody panel (250  $\mu$ L) and incubated in a dark room for 30 min. After incubation, samples were centrifuged for 5–10 min, decanted, and thoroughly vortex before the addition of red blood cell lysis buffer. After the 10-min lysis period, phosphate buffered saline was added and samples were centrifuged, decanted, and vortexed before analysis by flow cytometry (C6, Accuri, Ann Arbor, MI, USA). At least 10,000 events were counted in the lymphocyte gate, initially determined from front and side-scatter characteristics. Further gating to distinguish CD4+ and CD8+ populations was determined in the FL-2 channel via the PE fluorochrome. The markers for apoptosis (annexin V) or migration (CX<sub>3</sub>CR1) were further noted for cells in each subfraction via the FITC fluorochrome and FL-1 channel.

### 2.7. Statistical analyses

The Shapiro–Wilk normality test and homoscedasticity test (Mauchly) were used to test the normal distribution of the data. To control for sphericity, the correction of Greenhouse–Geisser was applied. Absolute changes from rest ( $\Delta$  baseline) values were calculated according to the following formula: [(measure–baseline)·baseline<sup>-1</sup>]-100. As we expected the absolute change from rest with regard to apoptotic and migratory markers to be similar to the change in cell counts, the Chi squared test ( $\chi^2$ ) was applied. The alpha level was set at  $p \leq 0.05$ . Differences between time-points (Pre, Post, 2H Post, 24H Post) were determined through a one-way repeated measures ANOVA, and Tukey HSD *post hoc* analysis when appropriate. Power analysis was carried out utilizing the data of Mars et al. in which a 45% increase in apoptotic cells were noted following an acute exercise bout (effect size = 0.8, alpha = 0.05, beta = 0.80) [20]. To detect this increase in lymphocyte apoptosis, a minimum of 8 subjects were necessary. The statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL).

### 3. Results

While the CD4+ cell count tended to increase immediately following the RT, no statistically significant changes were noted after

Hyper-1 and Hyper-3 ( $p = 0.35$ ; Fig. 1A). However, there was an increase in the percentage of CD4+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ cells count immediately after and 24 h post Hyper-1 ( $p < 0.05$ ), with no differences 2 h post Hyper-1 ( $p > 0.05$ ; Fig. 2A). Percentage of CD4+ positive cells count for annexin V+ increased 2 and 24 h post on Hyper-3 ( $p < 0.05$ ; Fig. 2B). Positive CD4+ cells for CXCR1+ decreased 2 and 24 h post Hyper-3 ( $p < 0.05$ ; Fig. 2B). There was no difference in CD4+ marked with annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ cells count immediately after Hyper-3 ( $p > 0.05$ ; Fig. 2B). The percent of CD4+/CD69+/annexin V+ cells count was significantly altered with RT exercise. When a 1-min rest period was utilized (Hyper-1), a significant increase in cells count was observed at 2 h post-exercise ( $p = 0.05$ , see Fig. 1C).

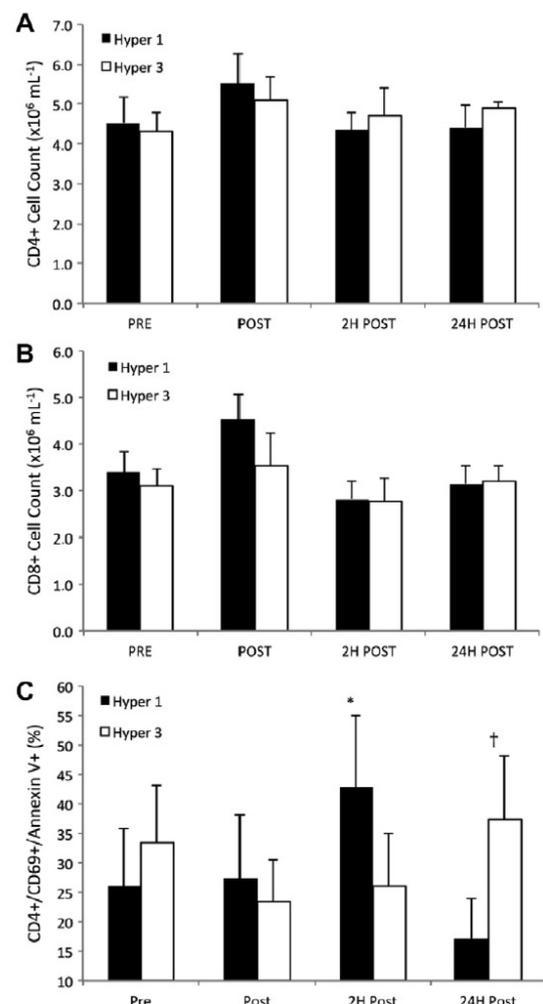


Fig. 1. CD4+ (A), CD8+ (B) cell count (average  $\pm$  SEM) and percentage of CD4+/CD69+/annexin V+ cells (C) at rest, immediately following RT exercise, and 2 and 24 h following bouts following ACSM recommendations for novice individuals with 1 min (Hyper 1) or 3 min (Hyper 3) rest periods ( $p = 0.35$ ,  $p = 0.75$  and  $p < 0.05$ , respectively). Significance was determined using one-way repeated measures ANOVA. \*Significantly greater than all other groups ( $p < 0.05$ ), †significantly greater than POST and 2H Post ( $p < 0.05$ ). PRE, before the exercise sessions; Post, immediately post-session; 2H Post, 2 h post-sessions; 24H post, 24 h post-sessions.

Alternatively, with 3 min rest between bouts (Hyper-3) a significant rise in CD4+/CD69+/annexin V+ cells count was noted at the 24 h post sampling point ( $p = 0.05$ , see Fig. 1C).

Similarly, CD8+ total cell count presented no change after Hyper-1 and Hyper-3 ( $p = 0.75$ ; Fig. 1B). There was a significant increase in CD8+ positive for annexin V+ and CX<sub>3</sub>CR1+ cells count immediately after, 2 and 24 h post Hyper-1 and Hyper-3 ( $p < 0.05$ ; Fig. 2C and D). Comparisons between Hyper-1 and Hyper-3 revealed no differences between the same time-points ( $p > 0.05$ ). No differences were noted for CD8+/CD69+/annexin V+ cells count ( $p > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate both markers of apoptosis and migration in different lymphocytes subsets after an acute RT session as recommended by the ACSM [2009] for novice individuals. The initial hypothesis raised was partially confirmed, and the main findings were: (a) ACSM guidelines [2009] for novice in RT can modulate the migration and apoptosis of CD4+ and CD8+ lymphocytes; (b) apoptosis and migration on CD4+ and CD8+ lymphocytes remain elevated 24 h after an acute RT session; (c) CD4+ and CD8+ cell count presented no change immediately, 2 and 24 h after RT; (d) CD8+ lymphocyte present a higher responsiveness than CD4+ after a RT session for apoptosis and migration; (e) rest-interval exerted minimal effects on apoptosis and migration of lymphocytes subsets.

Exercise induces physiological changes on the immune system, including lymphocytes and their subpopulations [1,3,6,21]. Previous studies observed that after intense exercise the immune response is characterized by a decreased lymphocyte count

(lymphocytopenia), suppressed function of cells associated with natural immunity, and suppressed lymphocyte proliferation [1,16]. Possible explanations for the observed lymphocytopenia after exercise are the elimination through programmed cell death (apoptosis), movement of cells from the circulation (migration), or a combination of both. Apoptosis has been demonstrated following endurance exercise of different duration and intensity, such as marathon runs, treadmill running, cycle ergometer exercise and intensive RT [4,22,23]. The mediators of exercise-induced lymphocyte apoptosis have been discussed intensely. Increased lactate production, acute-phase proteins, and decreased blood pH, as well as elevations on TNF- $\alpha$ , IL-6, C-reactive and cortisol are known triggers of apoptosis in different cell types [24–26], including lymphocytes [3,27,28]. These mediators can partially explain the increase of apoptosis in CD4+ and CD8+ lymphocyte subsets immediately and 2 h post-exercise. Surprisingly, the results from the present study revealed that apoptosis of CD4+ and CD8+ lymphocytes subsets remained increased 24 h after an acute RT session in novice individuals indicating that other factors and mechanisms are involved with the regulation of apoptosis in the post-exercise period. Tuan et al. [2008] observed an increase of pro-apoptotic death receptor ligands (TNF- $\alpha$  and sFasL) up to 72 h after three days of consecutive strenuous treadmill running in trained individuals, indicating that cell sensitivity to apoptosis can be enhanced even three days following intense exercise [23]. In addition, severe exercise (40 min of cycle ergometer at 80% of VO<sub>2</sub>max) has been shown to compromise cell resistance to oxidant-induced apoptosis and increased the activity of the pro-apoptotic proteins caspase-8, caspase-9 and caspase-3 on lymphocytes [29].

There is limited literature focused on the apoptotic response following RT. Boroujerdi and Rahimi [2011] reported that 4 sets of 5 RT exercises (bench press, leg press, shoulder press, arm curl,

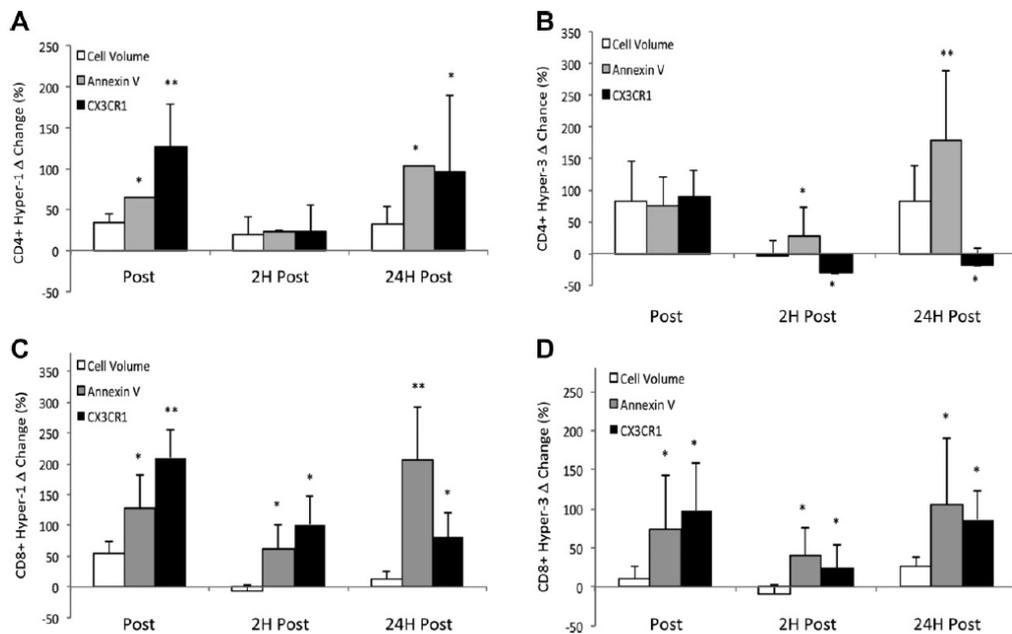


Fig. 2. Data (average  $\pm$  SEM) is for cell count, apoptosis (annexin V+), and cellular migration (CX3CR1+) in CD4+ and CD8+ lymphocytes at rest, immediately following RT exercise, and 2 and 24 h following bouts following ACSM recommendations for novice individuals with 1 min (Hyper 1) or 3 min (Hyper 3) rest periods. Significance was determined using the Chi squared test ( $\chi^2$ ) comparing the observed changes in annexin V+ and CX3CR1 to the expected changes in cell count. \*Indicates significant difference at  $p = 0.01$ ; \*\*indicates significant difference at  $p = 0.001$ . Post, immediately post-session; 2H post, 2 h post-sessions; 24H post, 24 h post-sessions.

and lat pull down) completed at 65 and 80% of 1RM did not significantly affect serum measurements of caspase-3 or caspase-9 in resistance-trained men. While the immune parameters specific to our study were not measured, the previous investigation utilized 2-min rest periods between sets, and a 1 s concentric and 3 s eccentric velocity speed [30]. A recent study from Krüger et al. [2011] compared the effects of two different RT intensities (60% versus 75% of 1RM) on the lymphocyte apoptotic response [4]. Results revealed that apoptosis as marked by annexin V+ was elevated up to 3 h after 75% of 1RM, but not after 60% of 1RM and returned to baseline values within 24 h. Additionally, the apoptotic response was significantly correlated with cortisol elevation 3 h after RT. These results are different as compared with the present study, where we found an increase in apoptotic lymphocyte subsets up to 24 h after RT. Differences may be associated to the use of annexin V+ on total lymphocytes and not specific subsets, cell migration was not evaluated, the protocol in the present investigation was according to ACSM recommendations for novice individuals, and the individuals who participated in our study were all considered untrained.

Cells migrate to and from the lymphoid pools in an attempt to maintain the homeostasis of immunity. Post-exercise lymphocytopenia is well-documented and suggested to be also attributed to the egress of lymphocytes from the vascular compartment [31]. Our data showed an increased migration of CD4+ and CD8+ lymphocytes subsets up to 24 h after RT. In accordance, Simpson et al. [2007] observed that migration of lymphocyte subsets to other body compartments could be responsible blood lymphocytes decrease rather than apoptosis and may contribute to the lymphocytopenia following high intensity downhill running [32]. Furthermore, Friedman et al. [2012] examined the effect of repeated intermittent high intensity bouts of exercise on lymphocyte subset migration [6]. They found a decrease in CD8+ and CD8+/CD45RA+ cells accompanied by a significant increase of CX<sub>3</sub>CR1 cell migration receptor [6]. This is consistent with the findings of previous investigations, reinforcing the idea of lymphocyte migration rather than apoptosis by using cell adhesion–activation markers in participants who completed intense exercise [32–34]. However, these events may be associated and/or obey a time-point physiological response after exercise.

We observed that CD8+ lymphocyte subset present a higher responsiveness than CD4+ for apoptosis and migration after an acute RT session. In fact, it has been reported that exercise affects CD8+ cell redistribution to a greater extent than CD4+ cells because of the effect of epinephrine, and the fact that CD8+ cells have a higher number of  $\beta$ 2-adrenergic receptors [21,35]. In addition, Friedman et al. [2012] showed that intense exercise induced lymphocytosis of CD8+ and CD8RA+ subsets accompanied by cellular migration from the vascular compartment rather than cell death [6]. It is possible that this response represents a protective mechanism to CD8+ cells with preference to migration into the lymphoid pools rather than deletion through apoptosis, so that these specialized cells with the ability to carry out cell to cell mediated death may be available upon a subsequent immune challenge. However, our results revealed that both markers of apoptosis and migration of CD4+ and CD8+ were elevated up to 24 h after an acute RT session. An additional explanation would be the return of these cells from lymphoid and non-lymphoid compartments, and possibly a delayed apoptosis in the circulation and/or tissue, considering that cell count remained stable during this time-point analysis [31]. Furthermore, Krüger et al. [2009] proposed that apoptosis of lymphocytes induced by exercise would be a regulatory mechanism to remove activated and potentially autoreactive immune cells [31]. The current investigation provides support regarding the CD4+ lymphocyte subset, as we observed significant increases in activated helper T cells that were positive for the apoptotic marker

(CD4+/CD69+/annexin V+) that was present from 2–24 h following the RT bouts. Finally and not less important, the “immune space theory” indicates that acute exercise might create immune space by removing excess clones of antigen-specific terminally differentiated T cells and potentially provide new and highly fulfill the vacant space and contribute to an expanded naïve T-cell repertoire [2].

Furthermore, a limited number of animal and human studies have determined the extent to which exercise induced immune changes alter susceptibility to diseases, such herpes simplex and influenza virus infection [36]. The clinical significance of these changes in innate and acquired immunity with acute exercise and training remains unknown. Acute bouts of moderate exercise (i.e., ACSM recommendations of prescription for novice individuals) have little impact on mucosal immunity, while prolonged exhaustive exercise (i.e., elite endurance athletes after single bouts of ultra-endurance exercise) can evoke a decrease in saliva secretion of immunoglobulin A (SIgA), which is the major effector of the mucosal immune system, providing the ‘first line of defense’ against pathogens [36]. Agreement exists that reduced levels of saliva SIgA are associated with increased risk of upper respiratory tract infections during heavy training. Future studies should be designed to challenge participants with antigenic stimuli (keyhole limpet haemocyanin or influenza) and assess relevant antigen-driven responses, including antigen specific cell-mediated delayed type hypersensitivity responses, or circulating antibody responses. Whether changes of this magnitude are sufficient to alter host defense, disease susceptibility or severity remain controversial.

The present study has some limitations that should be considered, we only provide data on numbers of cells expressing a particular surface marker that is associated with apoptosis or migration/cell adhesion and whether these cells effectively went into cell death or migrated into e.g. the vascular endothelium was not investigated. Lack of cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6), hormone (cortisol and epinephrine) and oxidative stress assays which can contribute to better comprehensive and significance of the results.

In summary, although RT sessions prescribed in the present study were according to the recommendations of the ACSM [2009] for novice individuals, significant apoptosis and migration of CD4+ and CD8+ lymphocytes was found even 24 h after exercise, with minimal effects of rest interval length. This produces new insights showing that these protocols are dose–response sufficient to active immune markers of apoptosis and migration, including a marker of activated lymphocyte, CD69+. Future studies should be designed to investigate if this increase of apoptosis and migration is accompanied by the replacement of naïve T-cells by the bone marrow.

#### Acknowledgments

The support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) from Brazil and by the Department of Kinesiology, Recreation, and Sport from Western Kentucky University.

#### References

- [1] B.K. Pedersen, A.D. Toft, Effects of exercise on lymphocytes and cytokines, *Br. J. Sports Med.* 34 (2000) 246–251.
- [2] R.J. Simpson, Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise “make space”? *Exerc Sport Sci. Rev.* 39 (2011) 23–33.
- [3] J.W. Navalta, D.A. Sedlock, K.S. Park, Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis, *Int. J. Sports Med.* 28 (2007) 539–542.
- [4] K. Krüger, S. Agnischock, A. Lechtermann, S. Tiwari, M. Mishra, C. Pilat, A. Wagner, C. Tweddell, I. Gramlich, F.C. Mooren, Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways, *J. Appl. Physiol.* 110 (2011) 1226–1232.

- [5] J.W. Navalta, D.A. Sedlock, K.S. Park, B.K. McFarlin, Neither gender nor menstrual cycle phase influences exercise-induced lymphocyte apoptosis in untrained subjects, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 32 (2007) 481–486.
- [6] R.A. Friedman, J.W. Navalta, E.A. Fedor, H.B. Kell, T.S. Lyons, S.W. Arnett, M.A. Schafer, Repeated high-intensity Wingate cycle bouts influence markers of lymphocyte migration but not apoptosis, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 37 (2012) 241–246.
- [7] M. Grujic, C. Bartholdy, M. Remy, D.D. Pinschewer, J.P. Christensen, A.R. Thomsen, The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus, *J. Immunol.* 185 (2010) 1730–1743.
- [8] C. Sekine, Y. Moriyama, A. Koyanagi, N. Koyama, H. Ogata, K. Okumura, H. Yagita, Differential regulation of splenic CD8<sup>+</sup> dendritic cells and marginal zone B cells by Notch ligands, *Int. Immunol.* 21 (2009) 295–301.
- [9] C. Auffray, D.K. Fogg, E. Narni-Mancinelli, B. Senechal, C. Trouillet, N. Saederup, J. Leemput, K. Bigot, L. Campisi, M. Abitbol, T. Molina, I. Charo, D.A. Hume, A. Cumano, G. Lauvau, F. Geissmann, CX3CR1<sup>+</sup> CD115<sup>+</sup> CD135<sup>+</sup> common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 595–606.
- [10] T. Imai, K. Hieshima, C. Haskell, M. Baba, M. Nagira, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, H. Nomiyama, T.J. Schall, O. Yoshie, Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion, *Cell* 91 (1997) 521–530.
- [11] H. Gabriel, A. Urhausen, W. Kindermann, Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion, *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 63 (1991) 449–457.
- [12] J.W. Navalta, D.A. Sedlock, K.S. Park, Blood treatment influences the yield of apoptotic lymphocytes after maximal exercise, *Med. Sci. Sports Exerc.* 37 (2005) 369–373.
- [13] D.L. Mayhew, J.P. Thyfault, A.J. Koch, Rest-interval length affects leukocyte levels during heavy resistance exercise, *J. Strength Cond. Res.* 19 (2005) 16–22.
- [14] K. Dohi, A.M. Mastro, M.P. Miles, J.A. Bush, D.S. Grove, S.K. Leach, J.S. Volek, B.C. Nindl, J.O. Marx, L.A. Gotshalk, M. Putukian, W.J. Sebastianelli, W.J. Kraemer, Lymphocyte proliferation in response to acute heavy resistance exercise in women: influence of muscle strength and total work, *Eur. J. Appl. Physiol.* 85 (2001) 367–373.
- [15] A.J. Koch, J.A. Potteiger, M.A. Chan, S.H. Benedict, B.B. Frey, Minimal influence of carbohydrate ingestion on the immune response following acute resistance exercise, *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 11 (2001) 149–161.
- [16] D.C. Nieman, D.A. Henson, C.S. Sampson, J.L. Herring, J. Suttles, M. Conley, M.H. Stone, D.E. Butterworth, J.M. Davis, The acute immune response to exhaustive resistance exercise, *Int. J. Sports Med.* 16 (1995) 322–328.
- [17] M. American College of Sports, American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults, *Med. Sci. Sports Exerc.* 41 (2009) 687–708.
- [18] J.F. Yarrow, P.A. Borsa, S.E. Borst, H.S. Sitren, B.R. Stevens, L.J. White, Neuroendocrine responses to an acute bout of eccentric-enhanced resistance exercise, *Med. Sci. Sports Exerc.* 39 (2007) 941–947.
- [19] J. Navalta, B. McFarlin, R. Simpson, E. Fedor, H. Kell, S. Lyons, S. Arnett, M. Schafer, Finger-stick blood sampling methodology for the determination of exercise-induced lymphocyte apoptosis, *J. Vis. Exp.* (2011).
- [20] M. Mars, S. Govender, A. Weston, V. Naicker, A. Chuturgoon, High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis?, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 249 (1998) 366–370.
- [21] B.K. Pedersen, L. Hoffman-Goetz, Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation, *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1055–1081.
- [22] D. Lagadic-Gossmann, L. Huc, V. Lecreur, Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 953–961.
- [23] T.C. Tuan, T.G. Hsu, M.C. Fong, C.F. Hsu, K.K. Tsai, C.Y. Lee, C.W. Kong, Deleterious effects of short-term, high-intensity exercise on immune function: evidence from leucocyte mitochondrial alterations and apoptosis, *Br. J. Sports Med.* 42 (2008) 11–15.
- [24] S.C. Huang, M.J. Tang, K.F. Hsu, Y.M. Cheng, C.Y. Chou, Fas and its ligand, caspases, and bcl-2 expression in gonadotropin-releasing hormone agonist-treated uterine leiomyoma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 4580–4586.
- [25] L.D. Hayes, G.F. Bickerstaff, J.S. Baker, Interactions of cortisol, testosterone, and resistance training: influence of circadian rhythms, *Chronobiol. Int.* 27 (2010) 675–705.
- [26] H. Fujii, S.H. Li, P.E. Szmitko, P.W. Fedak, S. Verma, C-reactive protein alters antioxidant defenses and promotes apoptosis in endothelial progenitor cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 2476–2482.
- [27] F.C. Mooren, A. Lechtermann, K. Volker, Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status, *Med. Sci. Sports Exerc.* 36 (2004) 1476–1483.
- [28] D.J. Samuel, K.P. Sundararaj, A. Nareika, M.F. Lopes-Virella, Y. Huang, Lactate boosts TLR4 signaling and NF-kappaB pathway-mediated gene transcription in macrophages via monocarboxylate transporters and MD-2 up-regulation, *J. Immunol.* 182 (2009) 2476–2484.
- [29] J.S. Wang, Y.H. Huang, Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men, *Eur. J. Appl. Physiol.* 95 (2005) 290–297.
- [30] S.S. Boroujerdi, R. Rahimi, The apoptotic response to resistance exercise with different intensities in athletes, *Medicina dello sport* 64 (2011) 13.
- [31] K. Kruger, S. Frost, E. Most, K. Volker, J. Pallauf, F.C. Mooren, Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296 (2009) R1518–1527.
- [32] R.J. Simpson, G.D. Florida-James, G.P. Whyte, J.R. Black, J.A. Ross, K. Guy, Apoptosis does not contribute to the blood lymphocytopenia observed after intensive and downhill treadmill running in humans, *Res. Sports Med.* 15 (2007) 157–174.
- [33] R.J. Simpson, G.D. Florida-James, G.P. Whyte, K. Guy, The effects of intensive, moderate and downhill treadmill running on human blood lymphocytes expressing the adhesion/activation molecules CD54 (ICAM-1), CD18 (beta2 integrin) and CD53, *Eur. J. Appl. Physiol.* 97 (2006) 109–121.
- [34] S. Hong, T.A. Johnson, N.H. Farag, H.J. Guy, S.C. Matthews, M.G. Ziegler, P.J. Mills, Attenuation of T-lymphocyte demargination and adhesion molecule expression in response to moderate exercise in physically fit individuals, *J. Appl. Physiol.* 98 (2005) 1057–1063.
- [35] T. Ibfelt, E.W. Petersen, H. Bruunsgaard, M. Sandmand, B.K. Pedersen, Exercise-induced change in type 1 cytokine-producing CD8<sup>+</sup> T cells is related to a decrease in memory T cells, *J. Appl. Physiol.* 93 (2002) 645–648.
- [36] N.P. Walsh, M. Gleeson, R.J. Shephard, J.A. Woods, N.C. Bishop, M. Fleshner, C. Green, B.K. Pedersen, L. Hoffman-Goetz, C.J. Rogers, H. Northoff, A. Abbasi, P. Simon, Position statement. Part one: immune function and exercise, *Exerc. Immunol. Rev.* 17 (2011) 6–63.

## **APÊNDICE 2**

## APÊNDICE B - E-MAIL E O ARTIGO CIENTÍFICO II ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO *CLINICAL PHYSIOLOGY AND FUNCTIONAL IMAGING*

**De:** [kirsi.timonen@ksshp.fi](mailto:kirsi.timonen@ksshp.fi)  
**Assunto:** Clinical Physiology and Functional Imaging - Manuscript CPF-2012-0066.R1  
**Data:** 12 de setembro de 2012 07:23:53 BRT  
**Para:** Guilherme Borges Pereira  
**Cc:** [monika.hultman@med.lu.se](mailto:monika.hultman@med.lu.se)

Ocultar

Entrada - Gmail 

12-Sep-2012

Dear Mr. Guilherme Pereira,

LETTER OF ACCEPTANCE

"Acute Effects of Resistance Training on Cytokines and Osteoprotegerin in Women with Metabolic Syndrome (ms no. CPF-2012-0066.R1)".

I am pleased to confirm that your paper has been accepted for publication in the *Clinical Physiology and Functional Imaging*.

If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete the combined payment and copyright licence form available from our website at: <http://mc.manuscriptcentral.com/clinicalphysiology> (click on Instructions and Forms button). If you do not wish your paper to be OnlineOpen, you are required to complete the standard Exclusive Licence Form available from our website at: <http://mc.manuscriptcentral.com/clinicalphysiology>. Please, note that your paper cannot be published until one of the above two completed forms has been received. Address the letter to the Editorial Assistant, Mrs. Monika Hultman, Department of Clinical Physiology, Malmö University Hospital, SE-205 02 Malmö.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

If you wish your paper to be OnlineOpen you will not need to send an Exclusive Licence Form. Instead, please complete the OnlineOpen payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Please note that authors receive a 25% discount on all Wiley books. Just follow this link to register for your book discount now: <http://www.wiley.com/WileyCDA/Section/id-302237.html>.

Thank you for supporting the journal!

Yours sincerely,

Kirsi Timonen  
Associate Editor

# Acute effects of resistance training on cytokines and osteoprotegerin in women with metabolic syndrome

Guilherme B. Pereira<sup>1</sup>, Ramires A. Tibana<sup>2</sup>, James Navalta<sup>3</sup>, Nuno M. F. Sousa<sup>1</sup>, Claudio Córdova<sup>2</sup>, Vinícius C. Souza<sup>4</sup>, Otávio T. Nóbrega<sup>4</sup>, Jonato Prestes<sup>2</sup> and Sergio E. A. Perez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Católica de Brasília, Brasília, Brasil, <sup>3</sup>Department of Kinesiology and Nutrition Sciences of the University of Nevada, Las Vegas, Nevada, USA and <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, Brasil

## Summary

### Correspondence

Guilherme Borges Pereira, Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310, São Carlos, São Paulo, CEP 13565-905, Brasil  
E-mail: guifisiologia@gmail.com

### Accepted for publication

Received 31 May 2012;  
accepted 12 September 2012

### Key words

chronic inflammation; cytokines; metabolic syndrome; osteoprotegerin; resistance training

Chronic inflammation has been identified as an important component of metabolic syndrome (MetS). Inhibition of the inflammatory mediator signals is a promising strategy against insulin resistance, atherosclerosis and other problems associated with MetS. Regular exercise decreases the components associated with MetS, including inflammatory cytokines. However, the relationship between an acute resistance training (RT) session, cytokine levels and MetS is unclear. Therefore, the aim was to evaluate the effects of a single bout of acute RT on tumour necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL) IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 and osteoprotegerin (OPG) in women with MetS. Twenty-four women were divided into 2 groups: metabolic syndrome (MetS) and non-metabolic syndrome (Non-MetS). After the familiarization and testing for 1 repetition maximum (1RM), participants completed 3 sets of 10 repetitions in the following exercises: machine leg press, leg extension, leg curl, chest press, lat front pull-down and machine shoulder press with 60% of 1RM followed by 15 repetitions of abdominal crunches. A rest interval of 1 min was allowed between sets and exercises. Plasma TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 and OPG were measured before, immediately post and 60 min after RT. MetS group showed significantly higher concentrations of IL-1 $\beta$  ( $P = 0.024$ ) and IL-6 ( $P = 0.049$ ) and a trend for higher TNF- $\alpha$  values ( $P = 0.092$ ) compared with Non-MetS. There was no group  $\times$  time interactions after the RT session on the measured cytokines and osteoprotegerin. In conclusion, acute RT session induced no additional increase in pro-inflammatory cytokines nor a decrease in anti-inflammatory cytokines and OPG in women with MetS.

## Introduction

There has been a dramatic increase in the worldwide prevalence of obesity (Catenacci *et al.*, 2009). Apart from this, obesity is associated with the development of several chronic diseases, including cardiovascular diseases, type 2 diabetes and metabolic syndrome (MetS) (Guh *et al.*, 2009). Low-grade chronic inflammation is one of the key metabolic alterations associated with excessive caloric intake, adiposity and reduced physical activity levels, and is involved in the pathobiology of obesity and MetS. The development of MetS components is primarily associated with low-grade systemic inflammation. For example, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) together

with interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) cytokines plays a central role on immune responses and inflammatory processes (Dinarello, 1996). Additionally, these inflammatory cytokines are known to contribute to the development of atherosclerosis, insulin resistance and hypertension, which are criteria for MetS diagnosis (Festa *et al.*, 2000; Robbie & Libby, 2001).

Resistance training (RT) is a potent activator of the immune system as seen by the changes in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine concentrations (Mathur & Pedersen, 2008; Beavers *et al.*, 2010). Previous investigations have shown that chronic exercise training reduces the production of pro-inflammatory mediators and increases the action of

## 2 Exercise on metabolic syndrome, G. B. Pereira et al.

anti-inflammatory mediators, which confers to exercise an important non-pharmacological strategy to reduce the long-term risk of MetS development (Mathur & Pedersen, 2008; Beavers et al., 2010). In spite of this, there is limited and controversial data regarding the effects of an acute bout of RT on inflammatory mediators in women with MetS (Mathur & Pedersen, 2008; Calle & Fernandez, 2010). Generally, when IL-6 is secreted by skeletal muscle during RT, there is an increase in anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and IL-1ra and a decrease in IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  several hours after the bout (Mathur & Pedersen, 2008; Brandt & Pedersen, 2010). However, previous studies employed a broad variation of exercise protocols, different muscle groups and intensities, and in general, they failed to demonstrate a consistency in most of the circulating cytokines measured after a single RT bout in untrained or trained healthy participants (Hirose et al., 2004; Peake et al., 2006; Bloomer, 2007; Buford et al., 2009; Uchida et al., 2009; Calle & Fernandez, 2010). A possible explanation could be related to the intervals for sampling that were too separate from the exercise bout leading to clearance of cytokines from circulation before being measured. Izquierdo et al. (Izquierdo et al., 2009) suggest that to evaluate an acute bout of RT, it is better to choose sampling time points as well as immediately, 1, 2, 4 or 6 h to cover a wider spectrum of cytokine kinetics. In addition, the protocols applied in most of the investigations did not correspond to daily exercise used in rehabilitation clinics and gyms for beginners (Kraemer et al., 2002). Moreover, the acute effect of an RT session on cytokines might be different in patients with MetS, which present low-grade chronic inflammation. The first step to investigate the metabolic adjustment and cellular repair processes initiate with acute studies, such as the response of cytokines to a single bout of RT in patients with MetS. These results can improve the understanding of the physiological adaptations to chronic training, safety and prescription.

Osteoprotegerin (OPG) is a secreted glycoprotein belonging to the TNF receptor superfamily and acts as a blocking receptor by binding to the receptor activator of the nuclear factor  $\kappa$ B ligand (Reid & Holen, 2009). Therefore, OPG is associated with obesity, atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus, coronary artery disease and endothelial dysfunction (Nabipour et al., 2010; Blazquez-Medela et al., 2011). Although previous research has target the effects of RT on cytokines, there are very limited data regarding the relationship between OPG, cytokines and MetS. In a cohort of patients with peripheral artery disease, serum concentrations of OPG were elevated in those individuals with obesity and the MetS (Golledge et al., 2008). In contrast, in an ageing male population, there was no statistical difference in OPG values between men with or without MetS (Gamage-Yared et al., 2006).

Thus, the aim of this study was to investigate the effect of an acute RT session on the serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1a, IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 cytokines and OPG immediately after and 60 min following exercise. We hypothesized

that patients with MetS would exhibit higher baseline values of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 than healthy participants and that an acute session of RT could increase anti-inflammatory and OPG levels and decrease pro-inflammatory cytokines mainly in patients with MetS.

## Materials and methods

### Participants

Twenty-four sedentary (< 2 h week<sup>-1</sup> of physical activity in the previous 12 months) middle-aged adult women were recruited on a voluntary basis from the local community. For details of the power of sample, see statistical analysis topic. To participate in the study, individuals were classified as overweight or obese according their body mass index (BMI) according to the World Health Organization guidelines. Each subject completed a thorough physical examination, including a medical history, resting and exercise electrocardiogram, blood pressure assessment and orthopaedic evaluation before the experimental protocols. The exclusion criteria included: physical disabilities, musculoskeletal disease, recent use of any medication and smoking or drug/alcohol abuse.

Participants were divided into two groups: non-metabolic syndrome (Non-MetS) and metabolic syndrome (MetS). MetS was defined by the presence of at least three of the following abnormal cardiovascular risk factors according to the joint statement from the International Diabetes Federation (IDF): (i) waist circumference > 88 cm in women, (ii) triglycerides  $\geq$  1.7 mmol/l, or on drug treatment, (iii) HDL-C < 1.3 mmol/l for women, or on drug treatment, (iv) blood pressure  $\geq$  130/85 mm Hg, or on drug treatment; and (v) fasting glucose  $\geq$  5.55 mmol/l, or on drug treatment (The IDF consensus worldwide definition of metabolic syndrome. Available at: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>). All participants signed an informed consent document, and the study was approved by Institutional Ethics Committee for Human Research (protocol #376/2010). Additionally, all experimental procedures followed the ethical consideration of the Helsinki Code. Investigators explained the purpose of the study, the protocol to be followed and the experimental procedures to be used prior to participation in the study. The general characteristics of the sample are presented on Table 1.

### Study design

Initially, participants performed anthropometric, body composition and hemodynamic evaluations and completed 2 weeks of familiarization on six exercises. After the familiarization period, participants completed the maximal strength testing (1RM) in each exercise and were assigned to a RT session 3 days later. During the pre-intervention period, participants remained at rest, and venous blood samples were obtained from the antecubital vein into a 10-ml collection tube using a standard Vacutainer apparatus at baseline. Prior the RT bout,

© 2012 The Authors

**Table 1** Baseline anthropometric, body composition, biochemical and hemodynamic characteristics of subjects.

	Non-MetS	MetS	P
Anthropometric parameters			
Age (years)	34 ± 6.8	35 ± 8.4	0.813
Body mass (kg)	60.9 ± 6.6	77.7 ± 11.7 <sup>a</sup>	0.000
Height (m)	1.57 ± 0.05	1.59 ± 0.06	0.448
Neck circumference (cm)	32.7 ± 1.7	35.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.000
Waist circumference (cm)	77.8 ± 6.3	91.5 ± 9.6 <sup>a</sup>	0.000
Hip circumference (cm)	99.3 ± 5.7	109.1 ± 8.5 <sup>a</sup>	0.003
Waist/hip ratio	0.78 ± 0.04	0.84 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.036
Waist/height ratio	0.49 ± 0.04	0.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.001
Body composition parameters			
Body mass index (kg m <sup>-2</sup> )	24.4 ± 2.2	30.4 ± 3.9 <sup>a</sup>	0.000
Body adiposity index (%)	14.8 ± 2.5	20.2 ± 3.9 <sup>a</sup>	0.001
Body fat (%)	29.3 ± 3.7	36.3 ± 3.9 <sup>a</sup>	0.000
Fat body mass (kg)	17.0 ± 5.6	28.5 ± 3 <sup>a</sup>	0.000
Lean body mass (kg)	40.5 ± 2.9	49.2 ± 5.9 <sup>a</sup>	0.000
Biochemical parameters			
Blood glucose (mg dl <sup>-1</sup> )	83.0 ± 8.5	97.8 ± 20.4 <sup>a</sup>	0.020
Triglycerides (mg dl <sup>-1</sup> )	73.4 ± 25.1	158.2 ± 49.2	0.370
HDL-C (mg dl <sup>-1</sup> )	54.5 ± 12.1	45.0 ± 10.0 <sup>a</sup>	0.010
Hemodynamic parameters			
Systolic blood pressure (mmHg)	111.0 ± 9.6	127.6 ± 14.6 <sup>a</sup>	0.004
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.8 ± 6.6	82.5 ± 10.0 <sup>a</sup>	0.039
Heart rate (HR) (bpm)	81.5 ± 12.4	82.6 ± 17.1	0.861

<sup>a</sup>Significantly different from Non-MetS.

participants underwent a warm-up consisting of 5 min walking on a treadmill (Johnson, Landmark Drive, Cottage Grove, Wisconsin, USA). The participants completed the resistance training protocol of the seven exercises (see below the RT session). After the exercise intervention, venous blood samples were obtained from the antecubital vein immediately after and 1 h following the bout for further analysis. For the RT protocol, participants started the resistance exercise at 0800 after a standardized breakfast. Participants were advised to avoid any type of exercise and alcohol for 2 days before the experiment (Fig. 1).

### Resistance training protocol

After a general warm-up and a specific warm-up session consisting of 15 repetitions at 30% of 1RM on each training device, the subjects performed a whole-body RT programme including seven different exercises: machine leg press, leg extension, leg curl, chest press, front lat pull-down and machine shoulder press followed by 15 repetitions of abdominal crunches. Resistance exercise intensity was defined individually as 60% of the 1RM and 10 repetitions each set. A rest interval of 1 min was used between sets and exercises. Total duration of the exercise test was about 40 min. Participants were instructed to perform each repetition at a moderate velocity (i.e. 2 s concentric and 2 s eccentric). The exercise

order was consistent for all participants from the familiarization to the RT session. To minimize the effects of diurnal variations, all testing was performed in the morning hours (0800 and 1000). All sessions were supervised by an experienced strength training professional. This progression of a RT was 'individualized' and appropriate and specific training goals for untrained patients with metabolic syndrome (Kraemer et al., 2002; Sundell, 2011).

### Anthropometric, body composition and hemodynamic evaluation

Height and weight were measured for the calculation of the BMI. All circumferences were obtained using a non-elastic tape; measurements were obtained in triplicate and then averaged. Neck circumference was obtained with the subject sitting with the head in the Frankfort horizontal plane position. Briefly, a measuring tape was applied around the neck inferior to the laryngeal prominence and perpendicular to the long axis of the neck, while the minimal circumference was measured and recorded to the nearest 0.1 cm (Yang et al., 2010). Waist circumference was measured at the mid-point between the lower rib margin and the iliac crest (Yang et al., 2010). Body adiposity index was determined by the following formula: (BAI = [(hip circumference)/((height)1.5)–18]) (Bergman et al., 2011). In addition, body fat percentage was determined by the Jackson and Pollock seven-site skinfold protocol (Pollock & Jackson, 1984). Skinfold thickness was measured at seven sites: sub-scapular, triceps, biceps, chest, abdomen, thigh and suprailiac, by a Lange skinfold caliper (Beta Technology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Three measurements were made of each skinfold, and the average value was used to calculate body composition.

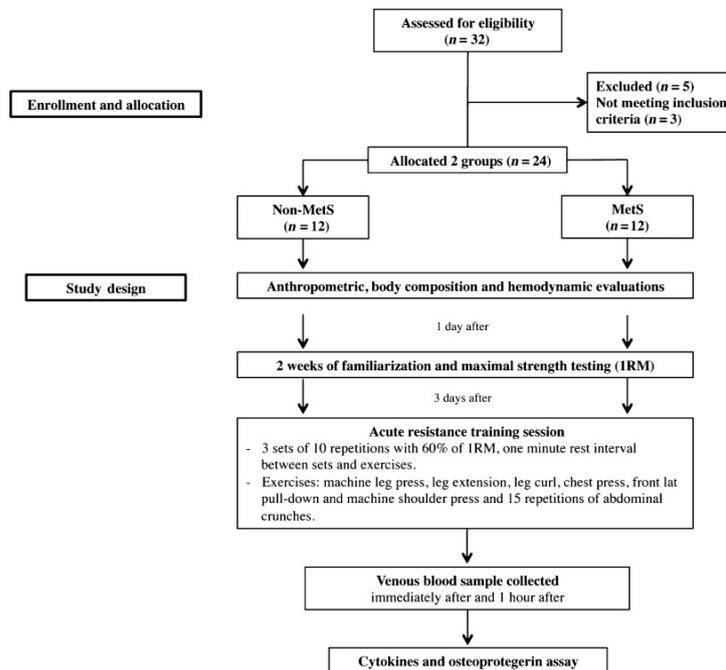
Systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured with a validated oscillometric device (Microlife 3AC1-1, Widnau, Switzerland). Blood pressure was assessed in triplicate (measurements separated by 5 min) with the mean value used for further analysis. Heart rate (HR) was measured by a HR monitor (Polar<sup>®</sup> S810i, Polar Electro Oy, Kempele, Finland).

### Familiarization and maximal strength testing

During the familiarization weeks, subjects were advised regarding the execution of proper technique. Participants completed 3 sessions/week, with one exercise for each main muscle group at a volume consisting of 3 sets and 10–12 sub-maximal repetitions.

After 2 weeks of adaptation to the exercises, 1RM tests were performed on four different days separated by a minimum of 48 h. All tests were performed with 10 min of rest intervals between exercises. The order of the exercises was as follows: chest press, front lat pull-down and machine shoulder press (days 1 and 2); machine leg press, leg extension and leg curl (days 3 and 4) (Johnson). The protocol consisted of a

## 4 Exercise on metabolic syndrome, G. B. Pereira et al.



**Figure 1** Flowchart describing the enrolment, allocation and design study.

light warm-up of 10 min of treadmill running followed by eight repetitions at 50% of estimated 1RM (according to the participants' capacity verified in the 2 weeks of adaptation). After a rest of 1 min, subjects performed three repetitions with 70% of the estimated 1RM. Following 3 min of rest, participants completed 3–5 1RM attempts interspersed with 3- to 5-min rest intervals, with progressively heavier weights (~5%) until the 1RM was determined. The range of motion and exercise technique was standardized according to the descriptions of Brown and Weir (Brown & Weir, 2001). After 48 h, all tests were repeated for the determination of the intraclass correlation (chest press,  $r = 0.99$ ; front lat pull-down,  $r = 0.97$ ; machine shoulder press,  $r = 0.98$ ; machine leg press,  $r = 0.97$ ; leg extension,  $r = 0.98$ ; and leg curl,  $r = 0.98$ ).

#### Cytokine assay

After blood collection, samples were centrifuged at room temperature at 2,000 rpm for 15 min. The serum was removed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Serum was analysed for serum amyloid A using a DADE Dimension RXL clinical chemistry analyzer (Dade-Behring, Inc, Newark, DE, USA). (Haugen et al., 2010) The analyzer was calibrated daily using Liquid-Assayed Multiqual (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and two levels of quality control with known concentrations were performed. In addition, serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-6, IL-10 and OPG were assessed using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA; EMD Chemicals Inc.,

San Diego, CA, USA). Standard curves were generated using commercially available microplate reader-compatible statistical software (MicroWin 2000, Microtek Laborsysteme GmbH, Overath, Germany). All samples were determined in duplicate to guarantee the precision of the results. The intra-assay coefficient of variation was 2.9–9.5%, the inter-assay coefficient of variation was 5.9–7.0%, and the sensitivity was  $0.0093 \text{ pg ml}^{-1}$ .

#### Statistical analysis

The power of the sample size was determined using G\*Power version 3.1.3 (Erdfelder, Faul, & Buchner, 1996; Kiel, Germany), based on the magnitude of the mean differences of cytokines between the groups. The required effect size for a sample size of twenty-four with the level of significance set at  $P = 0.05$  and power  $(1 - \beta) = 0.80$  was 0.60 (medium effect size). Only TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  achieved the required effect size. The variables IL-12, IL-1 $\alpha$ , IL-10 and OPG did not reach the required effect size for this study, undermining the power of the sample. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation, or mean and 95% confidence interval, as appropriate. For statistical analysis, anthropometric, biochemical, hemodynamic measurements and baseline cytokines levels were tested or logarithmically transformed to obtain a normal distribution (Shapiro Wilk,  $P > 0.05$ ). Student's  $t$ -tests for independent samples were used to compare the groups in terms of anthropometric, biochemical, hemodynamic measurements and baseline pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines levels. Fisher's exact test was used to find the significance of

© 2012 The Authors

change in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines levels postexercise and post-60-exercise between Non-MetS and MetS group. To perform the Fisher's exact test, the cytokine levels postexercise and post-60-exercise were categorized into 'increased', 'decreased' and 'no change' in relation to the baseline levels. The statistical analyses were performed using SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). A *P* value < 0.05 was considered as statistically significant.

## Results

Table 1 presents the general characteristics of the two groups. As a result of the study design, the MetS group was classified as overweight and obese and presented significantly higher values of BMI, body adiposity index, neck, waist and hip circumferences, waist-to-hip and waist-to-height ratio than the Non-MetS group (Table 1). In addition, the MetS group had higher values of glucose and lower values of HDL (Table 1). Hemodynamic parameters such as SBP, DBP and HR were within normal range for both groups.

Serum levels of cytokines and OPG at baseline, immediately after and 1 h postexercise are presented in Table 2. At baseline, the MetS group showed higher concentrations of IL-1 $\beta$  (*t* (11) = -2.627, *P* = 0.024) and IL-6 (*t* (21) = -1.992, *P* = 0.049) and a trend for higher values of TNF- $\alpha$  (*t* (22) = -1.763, *P* = 0.092). No statistically significant differences were observed for IL-1 $\alpha$ , IL-12, IL-10 and OPG between groups at baseline (Table 2). In addition, no statistical differences between groups were observed for cytokines and OPG immediately after and 60 min following exercise.

In the absence of changes detected by the Student's *t*-test, Fisher's exact test has been used to explore the significance of change in cytokines postexercise and post-60-exercise between Non-MetS and MetS groups. Table 3 shows the results from the Fisher's exact test comparing the change in cytokines and OPG between MetS and Non-MetS. 83.3% of Non-MetS showed a rise in TNF- $\alpha$  levels postexercise, while 58.3% of MetS showed a decrease or no change in TNF- $\alpha$  levels postexercise. Thus, there is a trend for women in the Non-MetS group to increase the levels of TNF- $\alpha$ , whereas MetS group

either decreases or presents no change postexercise (*P* = 0.089). Further, it was observed that 72.7% of the MetS group continued to present a decrease in TNF- $\alpha$  levels post-60-exercise, which was not observed in the Non-MetS group.

Among the Non-MetS and MetS groups, 50% showed a rise in IL-1 $\beta$  levels, while 50% showed a decrease in IL-1 $\beta$  postexercise. However, when compared to pre-exercise values, there was a trend (*P* = 0.145) for MetS to decrease IL-1 $\beta$  concentration (62.5%), while the Non-MetS group increased post-60-exercise (80%, see Table 3).

The majority of the Non-MetS group (75%) showed an increase in IL-6 levels post-60-exercise, while 54.4% of the MetS group showed a decrease post-60-exercise (Table 3). Non-MetS (70.0%) and MetS (54.5%) groups exhibited a trend towards increased IL-12 levels only post-60-exercise (*P* = 0.117). The majority of the MetS group showed a rise in IL-1 $\alpha$  levels postexercise (62.5%) followed by a decrease or no change post-60-exercise (87.5%), although this was not significant when compared with the Non-MetS group (*P* = 1.000 and *P* = 0.545). IL-10 levels tended to increase or present no change in MetS group (70%) and to decrease or no change in Non-MetS (71.4%) postexercise (*P* = 0.315). After RT exercise, both Non-MetS (85.7%) and MetS (88.9%) groups showed an increase in IL-12 levels post-60-exercise. Changes in OPG levels between pre- and postexercise or pre- and post-60-exercise showed a wide variation in both groups. In contrast, when compared to postexercise, both Non-MetS (72.7%) and MetS (58.3%) groups presented a slight fall or no change in OPG levels post-60-exercise, although this was not significant (*P* = 0.659; Table 3).

## Discussion

The aim of this study was to examine the effect of an acute RT session on the serum levels of cytokines and OPG in women with and without metabolic syndrome. Thus, our initial hypothesis was partially confirmed, because patients with MetS exhibited higher baseline values of IL-1 $\beta$  and IL-6 than Non-MetS participants. However, there were no significant changes after the acute RT session on cytokines and OPG. Fur-

**Table 2** Circulating serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10 and OPG at baseline as well as immediately and 1 h postexercise.

	Pre-exercise		Postexercise		Post-60-exercise	
	Non-MetS	MetS	Non-MetS	MetS	Non-MetS	MetS
TNF- $\alpha$ (pg ml <sup>-1</sup> )	11.5 (8.2–14.9)	17.4 (10.9–23.9)	14.6 (12.4–16.9)	19.3 (11.2–27.4)	16.4 (9.6–23.2)	14.8 (10.9–18.6)
IL-1 $\alpha$ (pg ml <sup>-1</sup> )	1.4 (0.1–2.9)	1.6 (0.6–2.6)	1.2 (0.3–2.8)	2.2 (0.7–3.7)	1.6 (0.0–3.1)	2.7 (0.0–5.4)
IL-1 $\beta$ (pg ml <sup>-1</sup> )	0.8 (0.4–1.1)	2.1 (1.0–3.1) <sup>a</sup>	1.1 (0.7–1.4)	2.6 (1.4–3.8)	1.2 (0.6–1.8)	2.8 (1.6–3.9)
IL-12 (pg ml <sup>-1</sup> )	2.1 (1.3–2.9)	2.5 (1.3–3.7)	2.4 (1.7–3.2)	2.8 (1.6–3.9)	2.8 (1.2–4.4)	2.4 (1.3–3.5)
IL-6 (pg ml <sup>-1</sup> )	4.5 (3.4–5.5)	6.3 (4.5–8.1) <sup>a</sup>	5.1 (4.1–6.3)	7.8 (4.6–11.0)	6.1 (4.5–7.8)	7.0 (3.7–10.2)
IL-10 (pg ml <sup>-1</sup> )	12.3 (8.3–16.3)	12.3 (8.6–16.1)	11.4 (10.2–12.6)	14.8 (9.4–20.3)	11.0 (6.8–15.2)	13.2 (7.8–18.6)
OPG (ng ml <sup>-1</sup> )	0.9 (0.7–1.1)	1.0 (0.8–1.1)	1.0 (0.8–1.1)	0.9 (0.7–1.1)	0.9 (0.7–1.0)	0.9 (0.7–1.1)

Values are expressed as means and 95% confidence interval.

TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor-alpha; OPG, osteoprotegerin.

<sup>a</sup>Significantly different from Non-MetS.

© 2012 The Authors

Clinical Physiology and Functional Imaging © 2012 Scandinavian Society of Clinical Physiology and Nuclear Medicine

## 6 Exercise on metabolic syndrome, G. B. Pereira et al.

**Table 3** Comparison of cytokines change in subjects with (MetS) and without (Non-MetS) metabolic syndrome.

	Pre- to postexercise			Pre- to post-60-exercise			Post- to post-60-exercise		
	Non-MetS	MetS	P value	Non-MetS	MetS	P value	Non-MetS	MetS	P value
TNF- $\alpha$			0.089			0.414			0.400
No change	–	1 (8.3)		–	–		–	–	
Increased	10 (83.3)	5 (41.7)		8 (66.7)	5 (41.7)		6 (50.0)	3 (27.3)	
Decreased	2 (16.7)	6 (50.0)		4 (33.3)	7 (58.3)		6 (50.0)	8 (72.7)	
IL-12			0.670			0.117			1.000
No change	1 (9.1)	–		2 (20.0)	–		3 (30.0)	2 (18.2)	
Increased	5 (45.5)	7 (63.3)		7 (70.0)	6 (54.5)		4 (40.0)	4 (36.4)	
Decreased	5 (45.5)	4 (36.4)		1 (10.0)	5 (45.5)		3 (30.0)	5 (45.5)	
IL-6			0.659			0.214			0.192
No change	2 (16.7)	–		–	–		–	1 (9.1)	
Increased	7 (58.3)	6 (54.5)		9 (75.0)	5 (45.5)		9 (75.0)	4 (36.4)	
Decreased	3 (25.0)	5 (45.5)		3 (25.0)	6 (54.4)		3 (25.0)	6 (54.5)	
IL-10			0.315			1.000			1.000
No change	1 (14.3)	1 (10.0)		1 (14.3)	–		–	–	
Increased	2 (28.6)	6 (60.0)		2 (28.6)	3 (33.3)		6 (85.7)	8 (88.9)	
Decreased	4 (57.1)	3 (30.0)		4 (57.1)	6 (66.7)		1 (14.3)	1 (11.1)	
IL-1a			1.000			0.558			0.545
No change	–	–		–	–		–	2 (25.0)	
Increased	3 (50.0)	5 (62.5)		2 (40.0)	5 (71.4)		2 (40.0)	1 (12.5)	
Decreased	3 (50.0)	3 (37.5)		3 (60.0)	2 (28.6)		3 (60.0)	5 (62.5)	
IL-1 $\beta$			1.000			0.145			0.633
No change	–	–		–	–		1 (10.0)	1 (12.5)	
Increased	6 (54.5)	5 (50.0)		8 (80.0)	3 (37.5)		4 (40.0)	2 (25.0)	
Decreased	5 (45.5)	5 (50.0)		2 (20.0)	5 (62.5)		5 (50.0)	5 (62.5)	
OPG			1.000			1.000			0.659
No change	–	1 (9.1)		–	–		–	1 (8.3)	
Increased	6 (54.5)	5 (45.5)		5 (41.7)	6 (50.0)		3 (27.3)	5 (41.7)	
Decreased	5 (45.5)	5 (45.5)		7 (58.3)	6 (50.0)		8 (72.7)	6 (50.0)	

P value obtained by Fisher's Exact test. The parenthesis values show the percentage of change in subjects.

thermore, women with metabolic syndrome had a trend for higher TNF- $\alpha$  values than Non-MetS women.

In the present study, patients with metabolic syndrome exhibited higher baseline values of IL-6 and IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  is one of the major proinflammatory cytokines synthesized mainly by monocytes and macrophages. Additionally, previous investigation showed that IL-1 $\beta$  expression is increased in visceral adipose tissue in women with obesity and metabolic syndrome (Shen et al., 2007). In obese subjects, a strong correlation exists between obesity and IL-6 levels. IL-6 is essential for the induced expression of C-reactive protein, suggesting that elevated C-reactive protein levels are secondary to an increase in IL-6 secretion. Furthermore, IL-6 levels are elevated in individuals with cardiovascular disease and are predictive of future ischaemic events. It was reported that weekly injections of recombinant IL-6 resulted in significant increases in IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and fibrinogen levels, and increased atherosclerosis in C57B1/6- and ApoE-deficient mice compared with controls (Huber et al., 1999). This led to the conclusion that proinflammatory cytokines and acute phase proteins such as IL-6, IL-1 $\beta$  and C-reactive protein participate in the development and progression of metabolic syndrome.

In the present study, there was no statistical difference between MetS and Non-MetS groups, although a trend ( $P = 0.09$ ) was demonstrated for higher values of TNF- $\alpha$  in MetS compared with Non-MetS at baseline (17.4 versus 11.5 pg/ml, respectively). Similar to our results, previous studies found no difference in TNF- $\alpha$  between obese patients with and without metabolic syndrome (You et al., 2004; Gnacinska et al., 2010). Others described higher concentrations of this cytokine in patients with metabolic syndrome, but only when NCEP ATP III criteria are taken into consideration (not according to IDF) (Xydakis et al., 2004). It is likely that the variation in defining central obesity using IDF criteria is the main reason for the reported differences found in the inflammatory markers measured in these investigations. According to the IDF definition, a lower cut-off point is needed to define the subject as having central obesity compared to NCEP ATP III. The IDF also requires central obesity as a prerequisite in the determination of MetS.

The metabolic adjustment and cellular repair processes to a single bout of exercise are more evident in the first weeks of training and may reflect some of the chronic training effects. In this sense, cytokines play a central function by initiating inflammatory and metabolic responses in an acute and chronic

perspective. In the present study, there were no significant changes in pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-12) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines after an acute RT session when group and time interactions were compared. These results are in accordance with Buford et al. (2009), who examined the acute effects of RT on serum cytokines in healthy postmenopausal women and observed no significant changes in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 3, 24 and 48 h post-exercise (Buford et al., 2009). Nonetheless, the Fisher's exact test showed a trend for reduction of 62.5% on IL-1 $\beta$ , 54.4% on IL-6 and 72.7% on TNF- $\alpha$  in the MetS group post-60-exercise. On the other hand, Non-MetS women exhibited an increase of 80% on IL-1 $\beta$ , 75% on IL-6 and 83.3% on TNF- $\alpha$  post-60-exercise.

Ferreira et al. (2010) also investigated the acute effect of a RT session on serum cytokines in middle-aged women (Ferreira et al., 2010). Again, there were no significant alterations in the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10 after an acute RT session. Furthermore, Prestes et al. (2009) evaluated the acute effect of a RT session and observed no significant differences in TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, leptin and resistin serum values immediately after exercise in postmenopausal women (Prestes et al., 2009). Differently from the present study, the above-mentioned studies did not evaluate individuals with MetS and used RT sessions with maximal repetitions (concentric failure), which may not be the best strategy to a novice individual with MetS (considering their metabolic conditions). Moreover, previous studies with male subjects also showed no change or controversial data after an acute RT session (Smith et al., 2000; Hirose et al., 2004; Peake et al., 2006; Pierdomenico & Cuccurullo, 2010).

The above-mentioned studies present a wide variation of muscles groups, intensities and RT protocols, and in general fail to demonstrate a consistency in the increase or a significant change in circulating cytokines measured immediately and/or in the first hours after a single bout of RT. Possible explanations could be related to several factors. First, muscle glycogen stores serve as an energy source in overweight women during an acute RT session. However, skeletal muscle glycogen depletion could be blunted during exercise, which may directly affect the production of IL-6. In this way, the modulatory effects of IL-6 on TNF- $\alpha$  production and other anti-inflammatory cytokines such as IL-1 $\alpha$  and IL-10 would be suppressed. Second, it has been demonstrated that contracting muscles can produce IL-6 and increase plasma concentrations (Steensberg et al., 2000). Buford et al. (2009) showed that skeletal muscle had a significant accumulation of transcripts for pro-inflammatory genes (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and IL-8) 3 h following the completion of a RT bout (Buford et al., 2009). In addition, it was observed that the timing for the peaks in IL-6 after RT protocols was around 3, 6, 12 or even 24 h (MacIntyre et al., 2001; Peake et al., 2006; Phillips et al., 2010). Third, the cytokine response may vary according to the type of RT, intensity, duration or recovery between exercise bouts and training status, which also modify stress

hormones, acidosis and oxidative stress. Finally, the specificity and the sensitivity of the assays used in the previous literature can explain the variation in the results.

Osteoprotegerin levels are directly associated with bone mass and some components of the metabolic syndrome, such as endothelial dysfunction, hypertension and atherosclerosis. We are the first to examine the time course changes in OPG after an acute RT session in women with and without metabolic syndrome. Results revealed no group and time interactions in OPG levels. There are no conclusive studies demonstrating the existence of a clear link between obesity, lipid profile, metabolic syndrome and OPG serum levels (Nabipour et al., 2010; Blazquez-Medela et al., 2011). Regarding the effect of exercise, previous studies have shown increased OPG concentrations immediately after exhaustive running (Ziegler et al., 2005; Kersch-Schindl et al., 2009; Scott et al., 2010). Increased circulating levels of OPG in conditions of significant bone loss have been interpreted to indicate a compensatory physiological response. However, without a measure of RANK-L and the use of a suitably sensitive assay, any interpretation of the association between OPG and bone turnover is incomplete (Yano et al., 1999; Scott et al., 2010).

The progression of a RT programme is dependent on the development of appropriate and specific training goals. The most of previous studies employed a broad variation of exercise protocols, different muscle groups and intensities, which do not necessarily correspond to daily training used in rehabilitation clinics and gyms for healthy beginners or patients with MetS (Hirose et al., 2004; Peake et al., 2006; Bloomer, 2007; Buford et al., 2009; Uchida et al., 2009; Calle & Fernandez, 2010). In the present study, the prescription of the RT was 'individualized', and the appropriate equipment, programme design and exercise techniques needed for the safe and effectiveness for healthy and patients with metabolic syndrome were emphasized (Kraemer et al., 2002; American College of Sports Medicine, 2009; Sundell, 2011). The results from this study suggest that a moderate intensity acute RT session induces no dramatic increase in circulating pro-inflammatory cytokines in women with metabolic syndrome. In addition, the Fisher's exact test approach and the confidence interval allowed the formulation of a more complete analysis on the acute effects of a RT session as opposed to statistical significance *per se* (Morton, 2009). The present study has some limitations that should be considered, such as the reduced number of participants and lack of more time points, apart from other metabolic and cytokine measures. Moreover, chronic adaptations to training should be investigated. The effect of RT protocols on the production of cytokines in muscle and leucocytes should also be considered.

In conclusion, an acute RT session promoted no additional systemic response of OPG, pro- (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-12) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines immediately and 60 min after exercise in women with metabolic syndrome. These results highlight the safety of submaximal RT

## 8 Exercise on metabolic syndrome, G. B. Pereira et al.

for persons with MetS, considering that no additional systemic elevation of pro-inflammatory cytokines was detected.

### Acknowledgments

The financial support provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) from Brazil.

### References

- American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* (2009); **41**: 687–708.
- Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin Chim Acta* (2010); **411**: 785–793.
- Bergman RN, Stefanovski D, Buchanan TA, Sumner AE, Reynolds JC, Sebring NG, Xiang AH, Watanabe RM. A better index of body adiposity. *Obesity (Silver Spring)* (2011); **19**: 1083–1089.
- Blazquez-Medela AM, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. Osteoprotegerin and diabetes-associated pathologies. *Curr Mol Med* (2011); **11**: 401–416.
- Bloomer RJ. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Med* (2007); **37**: 519–532.
- Brandt C, Pedersen BK. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J Biomed Biotechnol* (2010); **2010**: 520258.
- Brown L, Weir JP. Accurate assessment of strength and power, methods. *JEP online* (2001); **4**: 1–21.
- Buford TW, Cooke MB, Willoughby DS. Resistance exercise-induced changes of inflammatory gene expression within human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* (2009); **107**: 463–471.
- Calle MC, Fernandez ML. Effects of resistance training on the inflammatory response. *Nutr Res Pract* (2010); **4**: 259–269.
- Catenacci VA, Hill JO, Wyatt HR. The obesity epidemic. *Clin Chest Med* (2009); **30**: 415–444, vii.
- Dinareello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* (1996); **87**: 2095–2147.
- 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**: 163–171.
- Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation* (2000); **102**: 42–47.
- Gannage-Yared MH, Fares F, Semaan M, Khalife S, Jambart S. Circulating osteoprotegerin is correlated with lipid profile, insulin sensitivity, adiponectin and sex steroids in an ageing male population. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2006); **64**: 652–658.
- Gnacinska M, Malgorzewicz S, Lysiak-Szydłowska W, Sworczak K. The serum profile of adipokines in overweight patients with metabolic syndrome. *Endokrynol Pol* (2010); **61**: 36–41.
- Golledge J, Leicht AS, Crowther RG, Glanville S, Clancy P, Sangla KS, Spinks WL, Quigley F. Determinants of endothelial function in a cohort of patients with peripheral artery disease. *Cardiology* (2008); **111**: 51–56.
- Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* (2009); **9**: 88.
- Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skalleberg BS, Raastad T, Drevon CA. IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2010); **298**: C807–C816.
- Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, Suzuki K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev* (2004); **10**: 75–90.
- Huber SA, Sakkinen P, Conza D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999); **19**: 2364–2367.
- Izquierdo M, Ibanez J, Calbet JA, Navarro-Amezqueta I, Gonzalez-Izal M, Idoate F, Hakkinen K, Kraemer WJ, Palacios-Sarrasqueta M, Almar M, Gorostiaga EM. Cytokine and hormone responses to resistance training. *Eur J Appl Physiol* (2009); **107**: 397–409.
- Kerschman-Schindl K, Thalmann M, Sodeck GH, Skenderi K, Matalas AL, Grampp S, Ebner C, Pietschmann P. A 246-km continuous running race causes significant changes in bone metabolism. *Bone* (2009); **45**: 1079–1083.
- Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, Fleck SJ, Franklin B, Fry AC, Hoffman JR, Newton RU, Potteiger J, Stone MH, Ratamess NA, Triplett-McBride T, American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc* (2002); **34**: 364–380.
- MacIntyre DL, Sorichter S, Mair J, Berg A, McKenzie DC. Markers of inflammation and myofibrillar proteins following eccentric exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* (2001); **84**: 180–186.
- Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm* (2008); **2008**: 109502.
- Morton JP. Reviewing scientific manuscripts: how much statistical knowledge should a reviewer really know? *Adv Physiol Educ* (2009); **33**: 7–9.
- Nabipour I, Kalantarhormozi M, Larijani B, Assadi M, Sanjideh Z. Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism* (2010); **59**: 742–747.
- Peake JM, Nosaka K, Muthalib M, Suzuki K. Systemic inflammatory responses to maximal versus submaximal lengthening contractions of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev* (2006); **12**: 72–85.
- Phillips MD, Mitchell JB, Currie-Elolf LM, Yellott RC, Hubing KA. Influence of commonly employed resistance exercise protocols on circulating IL-6 and indices of insulin sensitivity. *J Strength Cond Res* (2010); **24**: 1091–1101.
- Pierdomenico SD, Cuccurullo F. Ambulatory blood pressure monitoring in type 2 diabetes and metabolic syndrome: a review. *Blood Press Monit* (2010); **15**: 1–7.
- Pollock ML, Jackson AS. Research progress in validation of clinical methods of assessing body composition. *Med Sci Sports Exerc* (1984); **16**: 606–615.
- Prestes J, Shiguemoto G, Botero JP, Frollini A, Dias R, Leite R, Pereira G, Magosso R, Baldissera V, Cavaglieri C, Perez S. Effects of resistance training on resistin, leptin, cytokines, and muscle force in elderly postmenopausal women. *J Sports Sci* (2009); **27**: 1607–1615.

### Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

- Reid P, Holen I. Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG). *Eur J Cell Biol* (2009); **88**: 1–17.
- Robbie L, Libby P. Inflammation and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* (2001); **947**: 167–179.
- Scott JP, Sale C, Greeves JP, Casey A, Dutton J, Fraser WD. The effect of training status on the metabolic response of bone to an acute bout of exhaustive treadmill running. *J Clin Endocrinol Metab* (2010); **95**: 3918–3925.
- Shen J, Arnett DK, Peacock JM, Parnell LD, Kraja A, Hixson JE, Tsai MY, Lai CQ, Kabagambe EK, Straka RJ, Ordovas JM. Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome. *J Nutr* (2007); **137**: 1846–1851.
- Smith LL, Anwar A, Fragen M, Rananto C, Johnson R, Holbert D. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. *Eur J Appl Physiol* (2000); **82**: 61–67.
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* (2000); **529 Pt 1**: 237–242.
- Sundell J. Resistance Training is an effective tool against metabolic and frailty syndromes. *Adv Prev Med* (2011); **2011**: 984683.
- Uchida MC, Nosaka K, Ugrinowitsch C, Yamashita A, Martins E Jr, Moriscot AS, Aoki MS. Effect of bench press exercise intensity on muscle soreness and inflammatory mediators. *J Sports Sci* (2009); **27**: 499–507.
- Xydakis AM, Case CC, Jones PH, Hoogeveen RC, Liu MY, Smith EO, Nelson KW, Ballantyne CM. Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction. *J Clin Endocrinol Metab* (2004); **89**: 2697–2703.
- Yang GR, Yuan SY, Fu HJ, Wan G, Zhu LX, Bu XL, Zhang JD, Du XP, Li YL, Ji Y, Gu XN, Li Y, Beijing Community Diabetes Study Group. Neck circumference positively related with central obesity, overweight, and metabolic syndrome in Chinese subjects with type 2 diabetes: Beijing Community Diabetes Study 4. *Diabetes Care* (2010); **33**: 2465–2467.
- Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* (1999); **14**: 518–527.
- You T, Ryan AS, Nicklas BJ. The metabolic syndrome in obese postmenopausal women: relationship to body composition, visceral fat, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* (2004); **89**: 5517–5522.
- Ziegler S, Niessner A, Richter B, Wirth S, Billensteiner E, Woloszczuk W, Slany J, Geyer G. Endurance running acutely raises plasma osteoprotegerin and lowers plasma receptor activator of nuclear factor kappa B ligand. *Metabolism* (2005); **54**: 935–938.