



DIFERENÇAS EM POPULAÇÕES DE CÉLULAS EXTERMINADORAS NATURAIS (NATURAL KILLERS-NK) SANGUÍNEAS PERIFÉRICAS ENTRE ATLETAS DE CAIAQUE E NÃO ATLETAS

DIFFERENCES IN PERIPHERAL BLOOD NATURAL KILLER CELL POPULATIONS BETWEEN ELITE KAYAKERS AND NON-ATHLETES

Grasiely Faccin Borges^{1,4}

Ana Maria Botelho Miranda Teixeira¹

Luís Manuel Lopes Pinto Rama¹

Susana Pedreiro³

Amândio Manuel Cupido Santos¹

Alain Guy Marie Massart¹

Francisco Bessone Alves²

Artur Paiva³

1. Centro para Esporte e Atividade Física, Faculdade de Ciências do Esporte e Educação Física, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

2. Faculdade de Cinética Humana, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal.

3. Centro de Histocompatibilidade, Coimbra, Portugal.

4. Instituto de Saúde e Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.

Correspondência:

Ana Maria Botelho Teixeira

Estádio Universitário, Pavilhão 3, Sta. Clara - 3040 Coimbra, Portugal

Gabinete: Pavilhão 3

E-mail: ateixeira@fcdef.uc.pt,

grasiely.borges@gmail.com

RESUMO

Introdução: O exercício estressante prolongado tem sido associado a uma depressão transitória da função imune, com rotinas de treinamento e competição intensas e prolongadas capazes de levar os atletas a uma deficiência imune. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi observar se o treinamento crônico foi capaz de produzir diferenças sustentáveis no sangue periférico (SP) subpopulações de leucócitos (LEU, granulócitos, monócitos, linfócitos totais, linfócitos B e T, e células CD4+ e CD8+T e células *natural killers*) de atletas de caiaque de elite quando comparados com não atletas. **Métodos:** A amostra incluiu 13 homens atletas de caiaque de elite, 20 ± 3 anos, $75,0\text{kg} \pm 7,9$ peso e $177,3 \pm 7,1$ cm estatura. O $\text{VO}_{2\text{max}}$ foi $58,3 \pm 7,8\text{mL.kg.min}^{-1}$. O grupo de não atletas incluiu sete homens saudáveis, idade 18 ± 1 ano de idade, $81,3 \pm 13,8\text{Kg}$ de peso corporal e $171,9 \pm 4,5\text{cm}$ de estatura. As amostras de sangue dos atletas foram coletadas no início da temporada de treinamento, após um período fora do treinamento de seis semanas. Populações de células sanguíneas periféricas foram identificadas por análise de citometria de fluxo. Para identificar as diferenças entre os grupos de atletas e não atletas, o teste U de Mann-Whitney foi utilizado. **Resultados:** Não foram identificadas diferenças entre os atletas de caiaque treinados e não atletas em repouso, exceto para células *natural killers* (CD3-CD56+) e os valores da subpopulação CD3-CD56+CD8+ os quais foram mais baixos nos atletas. **Conclusão:** Nosso estudo encontrou que, após um período prolongado sem treinamento (seis semanas), somente a população de NK CD3-CD56+ e, em especial, a subpopulação de altamente citotóxica CD3-CD56+CD8+ apresentou níveis mais baixos nos atletas de elite quando comparados com os homens destreinados.

Palavras-chave: atletas, células *natural killers*, linfócitos, linfócitos T, imunologia.

ABSTRACT

Introduction: Prolonged strenuous exercise has been associated with a transient depression of immune function, with prolonged intense training schedules and competition able to lead to immune impairment in athletes. **Objective:** The objective of this study was to see if chronic training was able to produce sustained differences in the peripheral blood (PB) leukocyte subpopulations (WBC, granulocytes, monocytes, total lymphocytes, B and T lymphocytes, CD4+ and CD8+ T cells and Natural Killer cells) of elite kayakers when compared to non-athletes. **Methods:** The sample comprised 13 elite male kayakers, 20 ± 3 years old, $75.0 \text{ kg} \pm 7.9$ weight and 177.3 ± 7.1 cm stature. The $\text{VO}_{2\text{max}}$ was $58.3 \pm 7.8 \text{ mL.kg.min}^{-1}$. The Non-athlete group comprised 7 health males, aged 18 ± 1 years old, 81.3 ± 13.8 kg of weight and $171.9 \pm 4.5\text{cm}$ stature. The athlete's blood samples were collected at the beginning of the training season, after an off period of six weeks of training. Peripheral blood cell populations were identified by flow cytometry analysis. To verify the differences between the athlete and non-athlete groups the Mann-Whitney U Test was used. **Results:** No differences between the trained kayakers and the non-athletes were found at rest except for Natural Killer cells (CD3-CD56+) and the CD3-CD56+CD8+ subset values that were lower in the athletes. **Conclusion:** Our study found that after a prolonged time without training (six weeks) only the NK CD3-CD56+ population and particularly the highly cytotoxic CD3-CD56+CD8+ subpopulation had lower levels in the elite athletes when compared to the untrained men.

Keywords: athletes, natural killer cells, lymphocytes, T-lymphocytes, immunology.

INTRODUÇÃO

O exercício prolongado e estressante tem sido associado a uma depressão transitória da função imune¹, com treinamentos e competições prolongados e intensos capazes de levar os atletas à disfunção imune. Contudo, não está claro se existem diferenças substanciais entre a po-

pulação de atletas de elite e não atletas. As medidas da função celular T e B não parecem ser afetadas por treinamento físico prolongado². Apesar disso, o sistema imunológico intrínseco responde diferentemente ao treinamento físico intenso. Relatos de atividade oxidativa de neutrófilos diminuída³ e decréscimo da expressão de citocinas em

monócitos e células dendríticas⁴, após fases de treinamento de alto volume e intensidade em nadadores em repouso quando comparados a controles sedentários e equiparados em idade, foram publicados. O efeito do treinamento físico sobre o número e função das células exterminadoras naturais (NK) ainda é discutido. Enquanto estudos de intervenção ou cruzados-seccionais reportaram aumento moderado na citotoxicidade de células NK (CCNK) após treinamento físico moderado⁵, o treinamento intenso tem mostrado a capacidade de alterar subgrupos de células NK e reduzir CCNK^{6,7}.

As células NK representam um componente da imunidade inerente a qual pode destruir células de tumor e infectadas por vírus, sem sensibilização prévia (i.e., não-MHC-restrita)⁸. Aproximadamente 40% das células NK (CD3-CD56+) em humanos expressam CD8. A subpopulação CD3-CD56+CD8+ em humanos apresentou ter atividade citolítica maior quando comparada com a subpopulação CD8⁹ tanto em repouso¹⁰ e após cultura¹¹ e mediar citotoxicidade autóloga de células leucêmicas mieloides em pacientes com leucemia mieloide aguda que foram submetidos a transplante de medula autóloga¹².

Foi demonstrado que, em repouso, a função imune em atletas, comparada a não atletas, apresenta mais semelhanças do que disparidades¹³. Apesar disso, há mais estudos que especifique subgrupos e os relacione a tempos específicos de treinamento que se fazem necessários. Ficamos interessados em examinar um grupo de atletas de resistência extremamente treinados (atletas de caiaque) antes do início da temporada de treinamento e compará-lo com um grupo de não atletas, observando vários parâmetros imunológicos. O objetivo deste estudo foi investigar, antes do início da temporada de treinamento e após o período de recuperação de seis semanas, as diferenças no sangue periférico na contagem de leucócitos, populações de linfócitos B, T e em nas subpopulações (CD4+, CD8+), e também nas células NK (CD3-CD56+) entre atletas (atletas de caiaque) e não atletas."

MATERIAIS E MÉTODOS

Características dos participantes

A amostra consistiu de 13 atletas de caiaque de elite, 20 ± 3 anos de idade, 75,0kg ± 7,9 peso e 177,3 ± 7,1cm estatura. O VO_{2max} foi 58,3 ± 7,8mL.kg.min⁻¹. O grupo de não atletas consistiu de sete homens, idade 18,2 ± 1,1 anos, 81,3 ± 13,8kg peso e 171,94 ± 4,51cm estatura.

Todos apresentavam história negativa de doenças cardiovascular ou hepática e exibiam valores normais de um exame de rotina clínica, incluindo valores de pressão arterial. Nenhum dos sujeitos fazia uso de qualquer medicação no tempo do estudo.

Após receber explicações orais e escritas, obteve-se o termo de consentimento e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos da Faculdade de Ciências do Esporte e Educação Física da Universidade de Coimbra.

Amostras de sangue venoso

Amostras de sangue foram coletadas em um ponto específico de tempo (em novembro) após um período de descanso de seis semanas e antes do início da temporada de treinamento para atletas do caiaque. As amostras de sangue para o grupo de não atletas foram coletadas em um ponto equivalente de tempo.

Amostras sanguíneas (15ml) foram coletadas da veia antecubital por punção venosa, respeitando uma pausa de 48 horas de descanso após a última sessão de treinamento. Análise completa da contagem de leucócitos (LEU), granulócitos (GR), linfócitos (Li) e monócitos (MO) foi feita utilizando um analisador sanguíneo (Beckman Coulter T66, EUA).

Citometria de fluxo

Subpopulações de linfócitos foram determinadas por citometria de fluxo (FACSCalibur; BD, San Jose, C.A., EUA). Foram incluídos o número total de linfócitos T (CD3+) e subpopulações de axiliadoras/reguladoras (CD3+CD4+), supressoras/citotóxicas (CD3+CD8+), linfócitos B (CD19+), células *natural killers* (CD3-CD56+) e CD3-CD56+CD8+ e CD3-CD56+CD8-. Estas células foram coradas com o Lymphogram (CYT-C001, Cytognos, Espanha) de acordo com instruções do fabricante. As células coradas foram analisadas em um citômetro de fluxo FACScan com ajuda do *software* CELLQuest (BD Biosciences). Os dados foram analisados pelo programa computacional *Infinicyt* (Cytognos, Espanha).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análises descritivas foram consideradas para a média e desvio padrão. Uma vez que a amostra não apresentou distribuição normal, o teste U de Mann-Whitney foi utilizado para verificar diferenças entre atletas e não atletas. O valor de significância estabelecido foi de $P < 0,05$. O *software* de análise estatística SPSS para Windows (versão 16.0. SPSS Inc, Chicago) foi utilizado.

RESULTADOS

Os resultados mostram que o número de leucócitos, linfócitos, granulócitos e monócitos foi semelhante e os grupos não apresentaram diferença significativa entre si (tabela 1).

Células CD3+T, CD4+ T coadjuvante, CD8+T supressora/citotóxica e contagem total de células e porcentagem de CD19+ B não evidenciaram diferenças significantes entre os dois grupos (tabela 2). Contudo, os sujeitos treinados apresentaram contagem de células e porcentagem de NK mais baixas (CD3-CD56+) quando comparados aos não atletas, especificamente no subgrupo CD3-CD56+CD8+ ($P < 0,05$, tabela 2).

Tabela 1. Contagem celular total e porcentagem das populações de células brancas de sangue periférico em atletas de caiaque de elite e homens não treinados. Os valores representam a média (± desvio padrão).

Parâmetros hematológicos	Atletas (N = 13)	Não treinados (N = 7)	P
CBS 10 ³ /μL	9,40 (1,63)	8,41 (1,88)	0,24
MO 10 ³ /μL	0,41 (0,16)	0,66 (0,69)	0,23
% MO	4,61 (1,88)	7,17 (6,63)	0,55
GR10 ³ /μL	5,60 (1,45)	5,31 (1,36)	0,32
% GR	63,03 (6,17)	63,10 (5,07)	0,96

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que as principais diferenças entre atletas e não atletas em repouso e após um período sem treinamento foram encontradas no número de células *natural killers* (CD3-CD56+) presentes no sangue periférico. O subgrupo CD3-CD56+CD8+, em especial, apresentou valores significativamente mais baixos do que os encontrados em não atletas (tabela 2).

Gleson *et al.*⁶ relataram que em atletas, em temporada de treinamento de natação, não houve alterações significantes nos números ou porcentagens de subgrupos de células B ou T, mas houve uma queda significativa no número e porcentagem de células *natural killers*. Por outro lado, um estudo de Pedersen *et al.*¹⁴, em que ciclistas treinados foram comparados com homens destreinados, a porcentagem de células NK foi mais alta nos atletas treinados, mas o estudo não relata em qual fase do treinamento os dados foram coletados.

De acordo com Gleeson e Bishop¹⁵, as alterações possibilitadas por uma série de exercícios prolongados pode levar a uma supressão natural da atividade das células NK e T, o que potencialmente poderia apresentar benefícios para pacientes transplantados em termos

Tabela 2. Linfócitos sanguíneos periféricos totais e contagem de células de subpopulações de linfócitos em atletas de caiaque e homens não treinados. Os valores representam a média (\pm desvio padrão).

Variável	Atletas de caiaque (N = 13)	Homens não treinados (N=7)	P
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	2.331,46 (454,59)	2.405,85 (685,09)	0,41
% Linfócitos	25,17 (5,39)	28,70 (6,09)	0,91
CD3+ ($10^3/\mu\text{L}$)	1.527,45 (467,32)	1.762,29 (466,96)	0,22
%CD3+	66,17 (16,21)	74,43 (11,65)	0,15
CD3+CD4+ ($10^3/\mu\text{L}$)	858,21 (280,30)	950,24 (282,30)	0,35
%CD3+CD4+	56,33 (6,27)	53,74 (5,97)	0,22
CD3+CD8+ ($10^3/\mu\text{L}$)	535,07 (176,57)	633,40 (209,00)	0,22
%CD3+CD8+	34,97 (5,53)	35,50 (3,78)	0,45
Proporção CD4+/CD8+	1,67 (0,43)	1,54 (0,29)	0,23
CD3+CD8+CD4+ ($10^3/\mu\text{L}$)	10,04 (5,50)	17,64 (17,11)	0,32
%CD3+CD8+CD4+	0,64 (0,22)	0,95 (1,04)	0,49
CD3+CD8-CD4- ($10^3/\mu\text{L}$)	116,71(54,75)	135,00 (67,43)	0,44
%CD3+CD8-CD4-	7,46 (2,27)	8,29 (4,70)	0,50
CD3-CD19+ ($10^3/\mu\text{L}$)	402,13(139,58)	348,84 (133,50)	0,22
%CD3-CD19+	17,19 (4,6)	14,40 (3,97)	0,10
NK CD3-CD56+ ($10^3/\mu\text{L}$)	59,62 (29,79)	96,12 (38,14)	0,02
% NK CD3-CD56+	2,46 (0,87)	5,28 (3,31)	0,02
NK CD3-CD56+CD8+ ($10^3/\mu\text{L}$)	24,85+(15,65)	63,27+(45,52)	0,03
% NKCD3-CD56+CD8+	43,15+(13,11)	49,15+(22,18)	0,29
NK CD3-CD56+CD8- ($10^3/\mu\text{L}$)	34,47+(20,35)	67,54+(55,67)	0,09
%NK CD3-CD56+CD8-	56,24+(13,04)	50,82+(22,20)	0,10

NK: células *natural killers*.

de redução do risco de rejeição. O efeito da intensidade do exercício na atividade citolítica de células NK parece ter um efeito bifásico, com um ganho inicial seguido por uma supressão tardia^{15,16}. As células NK têm demonstrado ser as células de maior resposta a uma série aguda de exercício⁵. Vários estudos apoiam o aumento na contagem celular de NK na circulação durante exercício progressivo, assim como a rápida recuperação de NK pós-exercício^{5,17-19}. Elas são rapidamente mobilizadas para o sangue periférico, provavelmente via tensão de cisalhamento (*she-*

ar stress), devido a aumento no fluxo sanguíneo juntamente com uma regulação para baixo de expressão de molécula de adesão induzida por catecolaminas²⁰. Este aumento na piscina periférica tem sido associado a uma supervisão imune aumentada²¹. Apesar disso, durante exercício prolongado, contagens de células NK circulantes podem cair abaixo dos valores pré-exercício²², em que as células deixam a circulação sanguínea periférica possivelmente para entrar em locais de dano muscular²³. A saída de células da circulação ou uma inibição de sua entrada pode significar que essas células, especialmente o subgrupo mais citotóxico, estão restando ou transitando para locais onde elas são necessárias para função imune ou inflamatória. O exercício não parece destruir células NK; em vez disso, elas são temporariamente realocadas para locais de reserva, como por exemplo as paredes das veias periféricas, em resposta à secreção induzida por exercício de catecolaminas e ativação de moléculas de adesão^{24,25}. A redução na contagem de células NK foi reportada como resistindo em até sete dias após o exercício²⁶, fato que parece ser confirmado por nossos resultados com períodos de tempo até mesmo mais longos.

CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que, mesmo após um período de descanso de seis semanas e antes do início da temporada de treinamento, o número de células NK em atletas PB é mais baixo do que os valores encontrados em não atletas. Este achado pode refletir em adaptação crônica ao treinamento, sugerindo que um decréscimo no número de células CD3-CD56+CD8+ pode refletir em risco menor de destruição de células autólogas e declínio do estado de inflamação juntamente com a redistribuição de células NK nos tecidos para supervisão imune.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro PTDC/DES/68647/2006 da Fundação Portuguesa de Apoio à Ciência e Tecnologia (FCT). Grasiely Faccin Borges foi financiada através de bolsa de doutorado pleno no exterior do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Brasil.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiology* 2007;103:693-9.
- Nieman DC, Brenkle D, Henson DA, Suttles J, Cook VD, Warren BJ, Butterworth DE, Fagoaga OR, Nehlsen-Cannarella SL. Immune function in athletes versus nonathletes. *Int J Sports Med* 1995;16:329-33.
- Pyne DB, Baker MS, Smith JA, Telford RD, Weidemann MJ. Exercise and the neutrophil oxidative burst: biological and experimental variability. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1996;74:564-71.
- Morgado JM, Rama L, Silva I, Inácio MJ, Henriques A, Laranjeira P, Pedreiro S, Rosado F, Alves F, Gleeson M, Pais ML, Paiva A, Teixeira AM. Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2011;112:471-82.
- Shephard RJ, Shek PN. Effects of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: a meta-analysis. *Sports Med* 1999;28:177-95.
- Gleeson M, McDonald WA, Cripps AW, Pyne DB, Clancy RL, Fricker PA. The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol* 1995;102:210-6.
- Suzui M, Kawai T, Kimura H, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ. Natural killer cell lytic activity and CD56(dim) and CD56(bright) cell distributions during and after intensive training. *J Appl Physiol* 2004;96:2167-73.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633-40.
- Addison EG, North J, Baksh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, et al. Ligation of CD8 alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* 2005;116:354-61.
- Srouf EF, Leemhuis T, Jenks L, Redmond R, Jansen J. Cytolytic activity of human natural killer cell subpopulations isolated by four-color immunofluorescence flow cytometric cell sorting. *Cytometry* 1990;11:442-6.
- Fuchshuber PR, Lotzová E. Differential oncolytic effect of NK-enriched subsets in long-term interleukin-2 cultures. *Lymphokine Cytokine Res* 1992;11:271-6.
- Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, et al. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol* 2002;117:821-7.
- Hoffman-Goetz L, editor. *Exercise and immune function*, CRC Press, New York, 1996:143-62.
- Pedersen BK, Tvede N, Christensen LD, Klarlund K, Kragbak S, Halkjær-Kristensen J. Natural killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. *Int J Sports Med* 1989;10:129-31.
- Gleeson M, Bishop NC. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 2005;10:43-8.
- Kappel M, Tvede N, Galbo H, Haahr PM, Kjaer M, Linstow M, Klarlund K, Pedersen BK. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J Appl Physiol* 1991;70:2530-4.
- Del Giacco SR, Manconi PE, Del Giacco, GS. Allergy and sports. *Allergy* 2001;56:215-23.
- Del Giacco SG, Malling HJ. Diversity of allergy and clinical immunology reunified by training at the EU level. *Allergy* 2004;59:575-6.
- Shinkai S, Shore S, Shek PN, Shephard RJ. Acute exercise and immune function. Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. *Int J Sports Med* 1992;13:452-61.
- Nagao F, Suzui M, Takeda K, Yagita H, Okumura K. Mobilization of NK cells by exercise: downmodulation of adhesion molecules on NK cells by catecholamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;279:R1251-6.
- Pedersen BK, Ullum H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 1994;26:140-6.
- Tvede N, Kappel M, Halkjær-Kristensen J, Galbo H, Pedersen BK. The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int J Sports Med* 1993;14:275-82.
- Malm C, Sjödin TLB, Sjöberg B, Lenkei R, Renström P, Lundberg IE, Ekblom B. Leukocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J Physiol* 2004;556:983-1000.
- Shephard RJ, Gannon G, Hay JB, Shek PN. Adhesion molecule expression in acute and chronic exercise. *Crit Rev Immunol* 2000;20:245-66.
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011;17:6-63.
- Shek PN, Sabiston BH, Paucod JC, Vidal D. Strenuous exercise and immune changes. In: Buguet A, Radomski MW. *Physical exercise, hyperthermia, immune system and recovery sleep in man*, 3 nd rev. ed. La Tronche, France: Centre de recherches du Service de Sante des Armees, 1994; 121-137.