



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO NA IMUNIDADE  
HUMORAL DE RATOS WISTAR EXERCITADOS**

---

Londrina  
2016

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO NA IMUNIDADE  
HUMORAL DE RATOS WISTAR EXERCITADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio.  
Co-orientador: Prof. Dr. Celio Roberto Estanislau.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Fernandes, Eduardo Vignoto.

Influência do estresse crônico na imunidade humoral de ratos Wistar exercitados / Eduardo Vignoto Fernandes. - Londrina, 2016.

51f. : il.

Orientador: Emerson José Venancio.

Coorientador: Celio Roberto Estanislau.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. imunoglobulinas, diferenças entre sexos, exercício físico e comportamento. - Teses. I. Venancio, Emerson José. II. Estanislau, Celio Roberto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

EDUARDO VIGNOTO FERNANDES

## **INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO NA IMUNIDADE HUMORAL DE RATOS WISTAR EXERCITADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Eduardo Ferreira de Carvalho Netto  
Consultor Científico, NOVARTIS, Brasil

---

Prof. Dr. Fabio Henrique Kwasniewski  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Solange de Paula Ramos  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 04 de março de 2016.

Dedico este trabalho primeiramente a meus pais, João Fernandes Filho e Vera Lúcia Vignoto Fernandes, por serem pessoas muito especiais na minha vida e ao meu irmão, Ricardo Vignoto Fernandes, por ser meu companheiro de todas as horas.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio, quem me deu a oportunidade de iniciar e apreciar esse maravilhoso caminho na busca pelo conhecimento. Com ele, eu desenvolvi o pensamento crítico, fundamental para a profissão que escolhi. Além disso, é um grande amigo, uma pessoa fantástica que me ajudou e ajuda muito em conselhos que me fazem ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao Prof. Dr. Celio Estanislau, que me abriu as portas para aprender sobre a área de psicobiologia, me fazendo compreender a importância de controlar as variáveis comportamentais de um experimento biológico. Também agradeço por todo o tempo investido em mim, como ex. no congresso que fomos a Dourado/SP conversar com o Dr. Herman.

A Profa. Dra. Solange de Paula Ramos, além de ser uma amiga de anos é uma profissional exemplar, sempre disposta a ajudar tanto em termos práticos como no fornecimento de materiais de pesquisa. Sua participação foi fundamental para o desenvolvimento crítico desse estudo.

Agradeço a Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano por aceitar contribuir na melhoria deste estudo. Sua participação é de grande valia, pois, contribuiu muito para a ciência, publicando e formando profissionais de excelência.

Ao Dr. Eduardo Ferreira de Carvalho Netto, um profissional muito competente e com grande conhecimento no estudo do estresse. Mesmo com sua curta passagem como docente da UEL, seus apontamentos foram muito importantes para o desenvolvimento desta pesquisa. Assim, como os professores supracitados, o tenho como um amigo.

Ao Prof. Dr. Fabio Henrique Kwasniewski, por aceitar contribuir com o seu conhecimento para o enriquecimento científico desta tese.

A Profa. Dra. Estefânia Gastaldello Moreira e ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono por aceitarem ser suplentes.

A Profa. Dra. Mara Regina Stipp Balarin por ceder seu laboratório para realização das análises hematológicas e aos alunos e funcionários que realizaram as análises. Também agradeço a Profa. Dra. Fabiana Andrade Machado que cedeu seu laboratório para que eu realizasse as análises de lactato e ao doutorando Paulo Victor por me auxiliar.

Agradeço ao Lucas Franco Carmona e a Mariana Carolina Batista Ferreira que me ajudaram como colaboradores assíduos em inúmeras etapas do experimento, como: cuidados aos animais, organização dos procedimentos e auxílio nas coletas.

Aos colegas de laboratórios (Miriele, Denise, Michele, Amanda e Carol) que estavam sempre disponíveis para me auxiliar quando necessário.

Agradeço aos meus pais João Fernandes Filho e Vera Lúcia Vignoto Fernandes e ao meu irmão Ricardo Vignoto Fernandes, sendo as pessoas que mais admiro e tenho carinho na vida. Sem eles nada disso estaria acontecendo.

Aos meus amigos de casa Fernando Pinheiro de Souza Neto e Márcio Scarone que são minha segunda família em Londrina. Também agradeço a Carla Cristiane da Silva, pela plenitude de sua amizade (como ela diria).

Agradeço aos inúmeros amigos que não citei, mas que fazem parte da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e a todos que me auxiliaram de forma direta e indireta durante a minha formação.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pós-graduação a mim concedida.

Seja um otimista,  
tire dos problemas soluções inovadoras,  
elas poderão contribuir positivamente para a vida.

Eduardo Vignoto Fernandes

FERNANDES, Eduardo Vignoto. **Influência do estresse crônico na imunidade humoral de ratos Wistar exercitados**. 2016. 57 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O exercício físico (EF) prescrito de forma adequada promove benefícios à saúde como controle do peso corporal, proteção contra o surgimento de doenças cardíacas e melhoria do sistema cardiorrespiratório, prevenção contra o diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia e contribui na regulação imunológica. Por outro lado, o estresse crônico, além de induzir doenças comportamentais, é um fator de risco para doenças inflamatórias, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, aterosclerose e câncer. Além disso, as respostas do organismo a um mesmo estressor são dependentes do sexo. Dessa forma, objetivo do presente estudo foi investigar a influência do *chronic variable stress* (CVS) na imunidade humoral de ratos Wistar exercitados. Ratos Wistar fêmeas e machos foram divididos em quatro grupos: Controle (C); Exercício (E); Estresse (S); Exercício e Estresse (ES). Os grupos E e ES foram exercitados por seis semanas, na primeira semana foi realizada a adaptação ao procedimento de nado (iniciado com 20 minutos e acrescentado 5 minutos/dia até o tempo de 40 minutos). A intensidade do nado foi controlada por meio de cargas atadas na região torácica dos ratos. O ajuste de carga foi realizado semanalmente, respeitando a variação do peso corporal de cada animal. Na segunda semana foi iniciada a utilização de sobrecarga (2 % do peso corporal na segunda semana, 3 % na terceira e 4 % na quarta, quinta e sexta semana de estudo). Na quarta semana de estudo, concomitante ao EF, os grupos S e ES iniciaram o CVS, procedimento que ocorreu diariamente por 19 dias. Os estressores utilizados no CVS foram: 1 h em geladeira a 4 °C; cepilho molhado, 12 h; isolamento social, 12 h; caixa inclinada em 45°, 12 h; caixa superlotada (caixa individual com 3 ratos), 12 h; luz acesa do biotério, 24 h. Para a avaliação da produção de anticorpos (IgM, IgG2a e IgG1), todos os grupos foram imunizados com IgY de galinha no 24° e 38° dias de estudo. Além disso, foram realizadas análises de hemograma completo; testes para avaliar os níveis séricos de creatina quinase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol, triglicerídeos, creatinina, uréia, proteína total, glicose e lactato; avaliação comportamental (teste de preferência por sacarose e campo aberto); avaliação do peso corporal e de órgãos. Nos resultados, observamos que o EF e o CVS potencializaram a produção de anticorpos IgG1 apenas nos ratos machos, quando realizados de forma isolada. Por outro lado, esse efeito não foi observado em ratos submetidos concomitantemente ao EF e ao CVS. O CVS provocou aumento das adrenais e redução na preferência por sacarose em machos. Nas variáveis relacionadas ao treinamento, o EF impediu o rápido aumento do lactato, controlou o peso corporal, reduziu a gordura peritoneal e hipertrofiou o coração em ambos os sexos. Concluímos que ratos machos Wistar são mais suscetíveis ao CVS que as fêmeas e que o EF promove melhorias morfofisiológicas independente do sexo. Em relação à imunidade, ambos, EF e CVS favoreceram a resposta imune humoral nos ratos machos.

**Palavras-chave:** Imunoglobulinas. Diferenças entre sexos. Exercício físico e comportamento.

FERNANDES, Eduardo Vignoto. **Influence of chronic stress on the humoral immunity of exercised Wistar rats**. 2016. 57 p. Thesis (Doctoral degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Physical exercise (PE), when prescribed appropriately, promotes health benefits such as weight control, protection against the onset of heart disease and improvements to the cardiorespiratory system, prevention of diabetes, hypertension and hypercholesterolemia and contributes to immune regulation. On the other hand, chronic stress, as well as inducing behavioral disorders, is a risk factor for inflammatory diseases, hypertension, cardiovascular disease, obesity, diabetes, atherosclerosis and cancer. Moreover, the body's response to the same stressor is sex dependent. Thus, the objective of this study was to investigate the influence of chronic variable stress (CVS) on the humoral immunity of exercised Wistar rats. Female and male Wistar rats were divided into four groups: Control (C); Exercise (E); Stress (S); Exercise and Stress (ES). The E and ES groups were trained for six weeks; during the first week, adaptation to the swimming procedure was performed (initiated at 20 minutes with 5 minutes/day added up until 40 minutes). The intensity of swimming was controlled by means of loads tied to the thoracic region of the rats. Load adjustment was carried out every week, according to the change in body weight of each animal. The use of a load began from the second week (2% of body weight in the second week, 3% in the third and 4% in the fourth, fifth and sixth weeks of the study). In the fourth week of the study, concomitant with PE, the S and ES groups began CVS, a procedure that occurred daily for 19 days. The stressors used in the CVS were: cold, 1 h in the refrigerator at 4 °C; wet bedding, 12 h; social isolation, 12 h; box tilted at 45°, 12 h; overcrowded housing (individual box with 3 rats), 12 h; light on in the vivarium, 24 h. To evaluate the production of antibodies (IgM, IgG2a and IgG1), all groups were immunized with chicken IgY on the 24<sup>th</sup> and 38<sup>th</sup> days of the study. In addition, the following analyzes were performed; complete blood count; test for evaluating the serum levels of creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol, triglycerides, creatinine, urea, total protein, glucose and lactate; behavioral evaluation (sucrose preference test and open field test) and; evaluation of body and organ weights. From the results, we observed that PE and CVS potentiated the production of IgG1 antibodies only in male rats, when performed in isolation. On the other hand, this effect was not observed in rats concomitantly submitted to PE and CVS. CVS caused an increase in adrenal gland weight and decrease in sucrose preference in males. Regarding the variables related to training, PE prevented the rapid increase in lactate, controlled body weight, reduced peritoneal fat and heart hypertrophy in both sexes. We concluded that male rats are more susceptible to CVS than females and that PE promotes morphophysiological improvements independent of sex. In relation to immunity, both PE and CVS favored the humoral immune response in male rats.

**Keywords:** Immunoglobulins. Differences between sexes. Physical exercise and behavior.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Efeito do estresse agudo e crônico sobre o SI .....	10
<b>Figura 2.</b> Efeito do EF de intensidade moderada favorecendo a produção de anticorpos .....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
CREBP	<i>cAMP-response element-binding protein</i>
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
CVS	<i>chronic variable stress</i>
EF	Exercício Físico
FC <sub>máx</sub>	Frequência Cardíaca Máxima
HPA	Eixo Hipotálamo–Pituitária–Adrenal
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
INF- $\gamma$	Interferon-gama
IgM	Imunoglobulina M
IL1- $\beta$	Interleucina-1-beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
SI	Sistema imunológico
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
Th1	Linfócitos T <i>herper</i> do tipo 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> do tipo 2
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TNF- $\beta$	<i>Tumor necrosis factor-beta</i>
VO <sub>2máx</sub>	Volume Máximo de Oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 ESTRESSE E SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	7
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO .....	11
1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE .....	16
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 OBJETIVO GERAL .....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	19
<b>APÊNDICE</b> .....	26
<b>Apêndice A:</b> Artigo submetido para a revista Physiology & Behavior .....	27
<b>4. CONCLUSÕES</b> .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ESTRESSE E SISTEMA IMUNOLÓGICO

O estresse é um fenômeno frequente na sociedade, podendo ocorrer de forma aguda ou crônica (STEIN et al., 2010). Ambas as formas estão relacionadas aos estressores que afligem os indivíduos a todo instante por ex., no trânsito, no trabalho e por problemas familiares (BARLOW; DURAND, 2015). Por isso, observa-se que o número de pessoas sob estresse é grande, variando de 18 a 65 %, dependendo do país ou região demográfica (CALAIS; ANDRADE; LIPP, 2003; SAHOO; KHESS, 2010; SBARAINI; SCHERMANN, 2008).

Dados epidemiológicos mostram que até 60% dos indivíduos acometidos por estresse crônico podem desenvolver depressão (KENDLER et al., 1995; POST, 1992), doença caracterizada pela desordem mental, na qual, o indivíduo apresenta tristeza, pessimismo, dificuldade de pensar ou concentrar-se, alterações no apetite, sonolência diurna e insônia à noite, sensação de desespero e desenvolvimento de pensamentos suicidas (KESSLER et al., 2005). Além disso, o estresse crônico também é um fator de risco para doenças inflamatórias crônicas, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, aterosclerose e câncer (AZUMA et al., 2015; KIBLER; JOSHI; MA, 2009; LU et al., 2013; MOORE; CUNNINGHAM, 2012; REPASKY; ENG; HYLANDER, 2015; WALES, 1995).

Em relação ao sexo, a prevalência de depressão, ao longo da vida, é duas vezes maior nas mulheres do que nos homens (GOBINATH; MAHMOUD; GALEA, 2014). Essa prevalência nas mulheres tem direta relação com os hormônios sexuais. O estrógeno em concentrações fisiológicas interage com seus receptores localizados no hipotálamo e inibe o eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), regulando por *feedback* negativo a produção do hormônio cortisol pelas glândulas adrenais (GOBINATH et al., 2014; SOLOMON; HERMAN, 2009). Por outro lado, mulheres que apresentam baixos níveis séricos de estrógeno não podem regular o eixo HPA o que implica em níveis aumentados de cortisol (SOLOMON; HERMAN, 2009).

O hormônio cortisol é o marcador biológico do estresse e encontra-se elevado em situações em que o organismo está em estado de alerta (fuga de um predador ou minutos antes de uma competição), permanecendo assim, até o desfecho da ação (HERMAN et al., 2012).

Além de aumentar o cortisol, o estresse também promove uma hiperatividade simpática. Isso ocorre porque a ativação de eixo HPA estimula a liberação de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal que irá aumentar a frequência respiratória, os batimentos cardíacos, a concentração de glicose sanguínea e o fluxo de sangue para os músculos esqueléticos (KVETNANSKY; LU; ZIEGLER, 2013). Essa rápida resposta do organismo em relação ao estresse tem relação com a sobrevivência do indivíduo (HERMAN et al., 2012).

Por outro lado, quando o indivíduo é acometido por longos períodos de estresse, ocorre um desequilíbrio no *feedback* negativo do eixo HPA e níveis elevados de cortisol são encontrados na circulação, o que diminui a quantidade dos receptores para o cortisol e cada vez mais cortisol é liberado na circulação na circulação (HERMAN et al., 2012). Pelo cortisol ser conhecido por regular a sobrevivência, excitabilidade e neurogênese neuronal, altos níveis de cortisol podem desencadear depressão. Isso ocorre porque o cortisol ativa os receptores de glicocorticóides, responsáveis por inibir a expressão dos fatores neurotróficos, como o *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). A redução na expressão desses fatores implica na morte das células neurais e na menor neurogênese hipocampal, condições relacionadas com o surgimento de sintomas depressivos (ANACKER et al., 2011; SOUSA; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2008; WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006).

Esse desequilíbrio nos níveis séricos do cortisol além, de provocar alterações comportamentais, também influencia o sistema imunológico (SI), que é definido como um conjunto de moléculas, células, tecidos e órgãos que funcionam coletivamente para proporcionar imunidade, ou proteção, contra organismos externos (ABBAS, 2012). Isso ocorre porque as células do SI, também apresentam receptores para o cortisol. A ativação desses receptores pelo cortisol inibe a produção de citocinas inflamatórias como interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e *Tumor necrosis factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) (HODES; KANA; MENARD, 2015; SEGERSTROM; MILLER, 2004), acarretando numa menor eficácia do organismo no

combate às doenças infecciosas e no aumento do tempo da cicatrização de feridas (ROBLES; GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005).

Estudos com animais também mostram evidências de que o estresse crônico suprime o SI (FRICK et al., 2009; KENNEDY et al., 2005). Camundongos submetidos ao estresse crônico têm um sistema imunológico comprometido. Como observado pela redução na proliferação celular e produção de citocinas pró-inflamatórias [linfócitos TCD4+, interferon-gama (INF- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$ ]. Essas alterações acarretam em maior susceptibilidade ao linfoma e a diminuição da sobrevivência desses animais (FRICK et al., 2009). Além disso, em outro estudo, foi observado que ratos submetidos ao estresse de choque inescapável suprimiram a produção de anticorpos: imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G2a (IgG2a) (KENNEDY et al., 2005).

Por outro lado, o estresse agudo é conhecido pela imunoproteção (Figura 1), isso ocorre porque numa situação de alerta (fuga ou luta), o estresse agudo prepara o SI para mudanças (ferimento ou infecção) que poderão ocorrer através de confrontos estressantes (ataque de um predador) (DHABHAR, 2014). Como exemplo, o estresse agudo de contenção estimulou a degranulação de mastócitos em ratos Wistar (CARUNTU et al., 2014). Em seres humanos o estresse agudo elevou os níveis séricos de IL-6 (GRIFFIS et al., 2013) e aumentou a atividade e a quantidade de células *Natural Killer* no sangue periférico (VAN VENROOIJ et al., 2012).

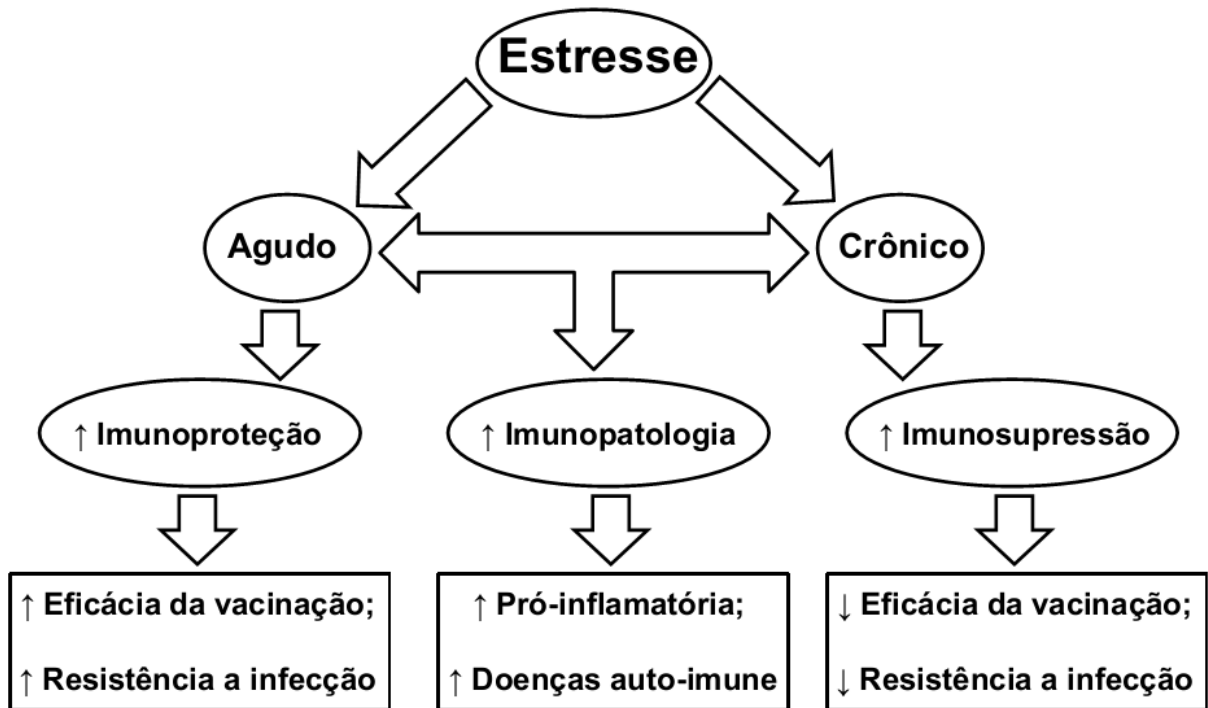


Figura 1. Efeito do estresse agudo e crônico sobre o SI. Adaptado de DHABHAR (2014).

A íntima relação entre o SI e o sistema nervoso central (SNC) pode estar associada ao surgimento da depressão, não somente relacionada a fatores comportamentais, mas também a uma hiperativação do sistema imune. Isso foi observado devido ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , que podem ser produzidas tanto pelas células imunes ou não imunes. Essas citocinas exercem um papel fundamental na comunicação entre o SNC e o SI, como exemplo, a IL-1 $\beta$  influencia o eixo HPA por estimular o hipotálamo a produzir o *corticotropin-releasing hormone* (CRH) (GADEK-MICHALSKA et al., 2013). No caso das citocinas IL-6 e do TNF- $\alpha$  quando reconhecidas pela glândula pituitária estimulam a produção do *adrenocorticotropic hormone* (ACTH), molécula que se comunica com as glândulas adrenais estimulando a produção de cortisol (GADEK-MICHALSKA et al., 2013).

Nesse sentido, uma possibilidade é que distúrbios de comportamento com origem inflamatória não devam ser tratados com medicamentos antidepressivos e sim com antiinflamatórios (GADEK-MICHALSKA et al., 2013). Além disso, a literatura tem apontado que medidas não farmacológicas como a prática de EF também são eficazes no controle dos distúrbios de comportamento e na regulação do SI (SCHUCH, 2014; TUON et al., 2014).

## 1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO

Em termos conceituais, o EF é uma forma planejada, estruturada e intencional de realizar práticas corporais com intuito de melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física, como força, resistência cardiorrespiratória e composição corporal (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). Dessa forma, aptidão física é entendida como a capacidade de realizar trabalho muscular de maneira satisfatória (CASPERSEN et al., 1985).

O EF pode ser classificado como agudo ou crônico. É conhecido como agudo aquele EF realizado uma única vez, ou seja, numa sessão isolada, por ex., 30 min. de caminhada (THOMPSON et al., 2001). Com a repetição dessa sessão, o EF passa a ser crônico, por ex., 30 min. de caminhada 3 vezes por semana (THOMPSON et al., 2001).

Outra forma de classificar o EF é pela intensidade (leve, moderada ou vigorosa). O EF de intensidade leve é aquele realizado de 20 a 50% do volume máximo de oxigênio ( $VO_{2máx}$ ) e da frequência cardíaca máxima ( $FC_{máx}$ ); o EF de intensidade moderada deve ser realizado entre 50-70% do  $VO_{2máx}$  e da  $FC_{máx}$  e; o EF de intensidade vigorosa deve ser realizado acima de 80% do  $VO_{2máx}$  e da  $FC_{Max}$  (LEANDRO et al., 2007).

A produção do lactato, molécula formada pela hidrogenação do piruvato, também é influenciada pelo EF. Quanto mais intenso o EF maior a produção de lactato, isso ocorre devido à via glicolítica predominar sobre a via oxidativa (DOS REIS SILVEIRA; DENADAI, 2002). Nesse sentido, o EF de intensidade leve compreende todas as intensidades de esforço que podem ser realizadas sem a modificação dos níveis de lactato sanguíneo em relação aos valores de repouso; o EF de intensidade moderada começa a partir da menor intensidade de esforço onde o lactato se eleva, e tem como limite superior, a intensidade correspondente à máxima fase de lactato estável; para o EF de intensidade vigorosa, não existe fase estável de lactato, com este elevando-se durante todo o tempo de esforço, até que o indivíduo entre em exaustão (GAESSER; POOLE, 1996).

Em estudos que envolvem animais, a mensuração dos níveis de lactato é amplamente utilizada para avaliar a intensidade do esforço (ARAUJO et al.,

2009; DE ARAUJO et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2013). Por exemplo, ratos Wistar apresentam máxima fase estável de lactato ao nadarem utilizando uma sobrecarga que varia de 4,5 a 5,5% do peso corporal, visualizado através do teste de sobrecarga incremental (ARAUJO et al., 2009; DE ARAUJO et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2013).

O EF tem papel importante na manutenção da saúde (AGUIAR et al., 2014; JURASCHEK et al., 2014; MONTGOMERY; DENNIS, 2004; MYERS et al., 2015; SWIFT et al., 2014). Esses benefícios são relacionados ao controle do peso corporal (SWIFT et al., 2014), proteção contra o surgimento de doenças cardíacas e melhoria do sistema cardiorrespiratório (MYERS et al., 2015), prevenção do diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia (AGUIAR et al., 2014; JURASCHEK et al., 2014) e melhoria da qualidade e do tempo de sono daqueles que sofrem de insônia (MONTGOMERY; DENNIS, 2004).

Com a evolução tecnológica, a população vem constantemente reduzindo a quantidade de gasto calórico por meio das práticas corporais (LOVEDAY; SHERAR, 2015). Essa mudança no estilo de vida tem gerado um aumento das doenças hipocinéticas (BAUER et al., 2014), ou seja, aquelas relacionadas com a falta de EF como obesidade, hipertensão arterial, cardiopatias, diabetes tipo II e osteoporose (HAMILTON; HAMILTON; ZDERIC, 2007). Nesse sentido, uma das primeiras investigações sobre a correlação entre pouco movimento e mortes por doenças cardiovasculares foi realizada na Inglaterra com motoristas e cobradores do ônibus *Routemaster*. Nessa pesquisa, foi observado que os cobradores sofriam menos com problemas cardiovasculares quando comparados aos motoristas e isso foi diretamente relacionado com a quantidade de movimento que cada função exigia (MORRIS et al., 1953).

Desde então, as pesquisas com intuito de investigar a importância da prática de EF e correlacioná-las com tratamento, prevenção e manutenção da saúde, tiveram um aumento considerável (CATTUZZO et al., 2014; OJA et al., 2015). Dentro desse contexto, entidades como o Colégio Americano de Medicina do Esporte e a Organização Mundial da Saúde fizeram estudos sobre a quantidade mínima semanal de exercícios para que a pessoa possa manter a saúde. As duas entidades consideram que, se tratando de exercícios aeróbios, o indivíduo adulto deve realizar 150 minutos/semana, quando a prática é de intensidade moderada e

75 minutos/semana quando é de intensidade vigorosa (HASKELL et al., 2007; WHO, 2010).

Estudos mostram que o EF moderado tem efeito benéfico sobre o SI como maior proteção contra infecções, aumento da efetividade das vacinas e aumento na proporção de células T diferenciadas na circulação (BACHI et al., 2013; EDWARDS et al., 2012; SIMPSON; BOSCH, 2014); na regulação hormonal e adaptações bioquímicas como nos níveis de cortisol, lactato, creatina quinase, creatinina, ácido úrico e uréia (DE ARAUJO et al., 2012); e no comportamento, auxiliando no tratamento da ansiedade e depressão (CAREK; LAIBSTAIN; CAREK, 2011). Considerando que as patologias afetam o funcionamento fisiológico do indivíduo, estudos sobre a influência do EF habitual no funcionamento dos sistemas fisiológicos podem contribuir para o desenvolvimento de novas formas de prevenção, controle e tratamento das doenças (BAUER et al., 2014; WATERS et al., 2011).

Dentro desse contexto, as pesquisas que avaliam os efeitos do EF sobre o SI têm crescido nos últimos anos (KRUGER; MOOREN, 2014; PASCOE; FIATARONE SINGH; EDWARDS, 2014). As primeiras investigações que relacionam o EF intervindo no SI tiveram início no final dos anos sessenta. Nesse período, a ênfase era verificar se o EF poderia influenciar na quantidade de proteínas secretadas na urina, como por ex., imunoglobulinas, após a sessão de exercício (POORTMANS; JEANLOZ, 1968). Desde então, pesquisas têm sido realizadas com intuito de elucidar como o EF pode modular o SI (KRUGER; MOOREN, 2014; PASCOE et al., 2014).

O efeito imunomodulador do EF tem sido observado tanto em estudos experimentais com animais e seres humanos (OLIVO et al., 2014; PERANDINI et al., 2014). Essa imunomodulação é dependente da intensidade do esforço, no qual, o EF de intensidade moderada é conhecido por promover adaptações positivas ao SI (MACKINNON, 2000; SIMPSON; BOSCH, 2014), independente se realizado de forma aguda ou crônica (PASCOE et al., 2014).

Os padrões de citocinas produzidos pelos linfócitos T *helper* (Th), são influenciados pelo EF (GHOLAMNEZHAD et al., 2014; LOWDER; PADGETT; WOODS, 2006; SHIMIZU et al., 2008; VISETNOI et al., 2009; ZHAO et al., 2012). Existem diferentes subpopulações de linfócitos Th. As duas mais estudadas são os linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) ou linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2). Os

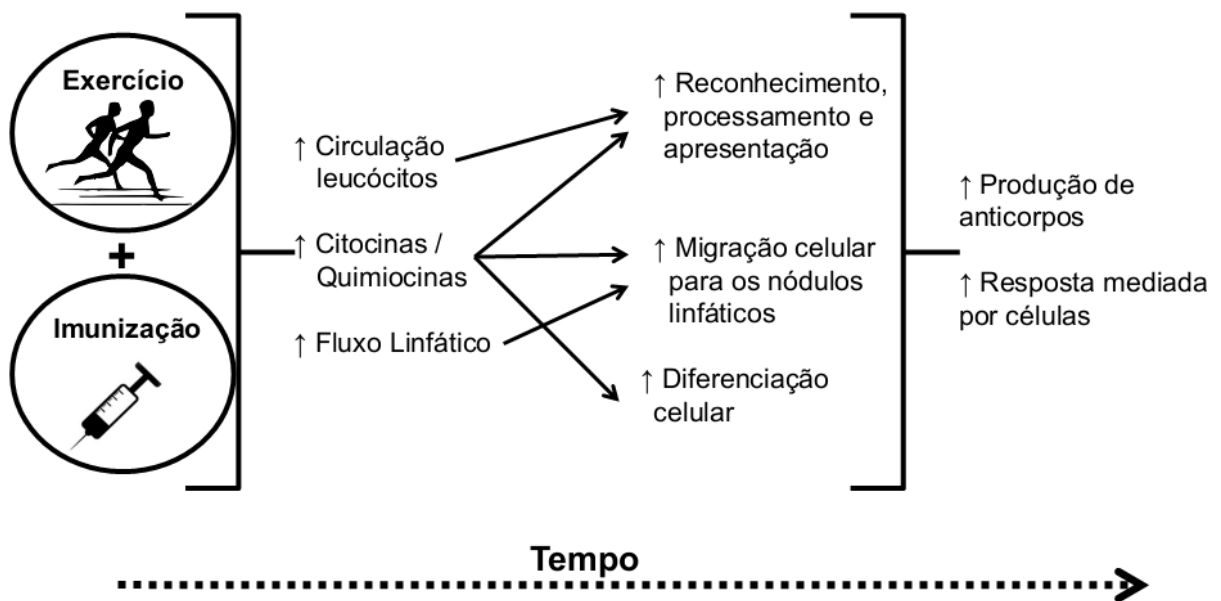
linfócitos Th1 são essenciais na resposta imune mediada por células, na defesa contra patógenos intracelulares e produzem citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e interleucina-2 (IL-2). Enquanto que os linfócitos Th2 produzem citocinas antiinflamatórias como interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), sendo responsáveis pela defesa do hospedeiro contra patógenos extracelulares e pelo desenvolvimento da resposta imune humoral. Além disso, as citocinas do padrão Th1, p.ex. IFN- $\gamma$ , suprimem a produção de citocinas do padrão Th2 e citocinas do padrão Th2, como a IL-4, suprimem a produção de citocinas do padrão Th1 (GHOLAMNEZHAD et al., 2014; ZHAO et al., 2012).

A imunomodulação exercida pelo EF de intensidade moderada sobre o SI é dependente da IL-6 produzida pelo músculo (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008; REIHMANE; DELA, 2014; STEENBERG, 2003). Ao contrário do processo inflamatório, que estimula a produção de IL-6 pelas células mononucleares via NF- $\kappa$ B, o exercício físico de intensidade moderada estimula a produção de IL-6 no músculo sem lesão via p38 MAPK e/ou *Calcineurin*-NFAT. A fosforilação dessas moléculas ativa fatores de transcrição (CREBP, p300, CBP, NFAT e AP-1) que irão atuar na produção da IL-6, independente da via do NF- $\kappa$ B que não é ativada pela contração muscular (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008). A IL-6 produzida pelo músculo, tem ação anti-inflamatória, estimulando a produção de IL-10, cortisol e inibindo a produção de TNF- $\alpha$ , favorecendo o padrão de resposta Th2 (REIHMANE; DELA, 2014; WOODS; VIEIRA; KEYLOCK, 2006).

Isso foi observado em camundongos infectados com *Streptococcus pneumoniae* 72 horas após realizarem um protocolo de EF de intensidade moderada por 4 semanas, no qual, o EF atenuou o crescimento bacteriano e o processo inflamatório no pulmão quando comparados aos animais controles (OLIVO et al., 2014). Tais achados são suportados, pelo fato do EF de intensidade moderada favorecer a produção de IL-6 pelo músculo via MAPK e ter efeito antioxidante (LIMA et al., 2015; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2008; REIHMANE; DELA, 2014; TUNG et al., 2015). Em outro estudo, camundongos submetidos a um protocolo de EF de intensidade moderada, iniciado após a infecção com o vírus influenza, apresentaram menores quantidades de células infiltradas no pulmão e redução da carga viral (LOWDER et al., 2006).

Em indivíduos vacinados, o EF de intensidade moderada é conhecido por aumentar a migração dos linfócitos para o sítio de administração da

vacina, pelo maior reconhecimento e processamento do antígeno; pela maior quantidade dos monócitos e células dendríticas circulantes; e pelo aumento da migração das células que estão nos sítios do antígeno para os nódulos linfóides, condição que favorece a produção de anticorpos (PASCOE et al., 2014), Figura 2. Como exemplo, idosas participantes de um programa de EF por 12 meses, produzem maiores níveis de anticorpos (IgM e IgG) anti-influenza em relação as mulheres sedentárias (BACHI et al., 2013). Outro estudo, mostrou que idosos submetidos por 10 meses ao EF (25 a 30 minutos/semana, 3 vezes/semana), também apresentaram maior produção de anticorpos contra influenza em decorrência do EF (KOHUT et al., 2004). Além da vacina contra influenza, o EF de intensidade moderada também foi eficaz em potencializar os efeitos da vacina pneumocócica. Jovens adultos imunizados com a vacina pneumocócica, após 15 minutos de EF moderado, apresentaram maior produção de anticorpos quando comparados aos não exercitados (EDWARDS et al., 2012).



**Figura 2.** Efeito do EF de intensidade moderada favorecendo a produção de anticorpos. Adaptado de PASCOE et al. (2014).

Devido o EF de intensidade moderada apresentar um papel positivo na regulação imunológica, estudos têm destacado várias formas de aplicá-lo como medida de intervenção não medicamentosa para o tratamento (PERANDINI et al., 2014) e prevenção (CATTUZZO et al., 2014; OJA et al., 2015) de doenças. Como

exemplo, o EF de intensidade moderada reduziu os níveis anormalmente elevados de algumas citocinas (INF- $\gamma$ , IL-10, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), em mulheres portadoras de Lúpus Eritematoso Sistêmico (PERANDINI et al., 2014). Outro trabalho mostrou que mulheres portadoras de câncer de mama utilizam o EF para diminuir a fadiga corporal acarretada pela doença, com isso, também se observou melhoria na qualidade de vida das pacientes (MENESES-ECHAVEZ; GONZALEZ-JIMENEZ; RAMIREZ-VELEZ, 2015). Nesse sentido, fica evidente a importância da prática de o EF de intensidade moderada na imunomodulação do SI.

### 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE

Pesquisas com humanos e animais suportam uma ação positiva do EF sobre as alterações fisiológicas e mentais causados pelo estresse, sendo cada vez mais aceito como uma intervenção que pode reduzir as disfunções cognitivas e os distúrbios comportamentais, como depressão e ansiedade (JIANG; DANG; LI, 2014; MARQUES et al., 2015; TUON et al., 2014; YAU et al., 2014). Essa eficiência do EF em controlar o comportamento tem sido comparada ao tratamento farmacológico e intervenções psicológicas (RETHORST; WIPFLI; LANDERS, 2009). No entanto, a quantidade ideal e o tipo de exercício para uma máxima proteção ainda não são conhecidos, mesmo assim, indivíduos fisicamente ativos exibem menos problemas de saúde, principalmente quando se deparam com situações de estresse, observado pela normalização dos níveis séricos de cortisol e de serotonina, moléculas que se encontram alteradas em indivíduos sob estresse (MARQUES et al., 2015).

Com a exposição ao estresse o indivíduo libera elevados níveis de cortisol que tem sido apontado como capaz de reduzir a expressão de BDNF. Nos casos de estresse crônico, os níveis de BDNF se mantêm baixos, e isso leva à atrofia do hipocampo (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006). Essa atrofia do hipocampo e de outras estruturas límbicas tem sido observada em indivíduos com depressão (WARNER-SCHMIDT; DUMAN, 2006).

Ao contrário, o EF de intensidade moderada é conhecido por prevenir os efeitos supressores do estresse sobre a expressão de BDNF, aumentar

a neurogênese hipocampal, a plasticidade sináptica e favorecer a sobrevivência neural (IERACI et al., 2015; SCHOENFELD et al., 2013), mostrando que o EF tem um papel chave no controle da depressão (IERACI et al., 2015). Exemplo disso foi observado em ratos Sprague-Dawley submetidos concomitantemente ao estresse e ao EF (JIANG et al., 2014). Nesse estudo, os efeitos do estresse foram inibidos pelo EF, sendo observados em testes comportamentais (preferência por sacarose e campo aberto) e pelo aumento na expressão do mRNA para o BDNF (JIANG et al., 2014).

Pelo fato do EF ser efetivo na prevenção e no tratamento dos distúrbios comportamentais as pesquisas têm aplicado o EF como estratégia de intervenção e controle de doenças como por ex., depressão e distúrbio do pânico (BRUMBY et al., 2013; KLAPERSKI et al., 2014; PLAG et al., 2014; WILES; CAFARELLA; WILLIAMS, 2015). Dessa forma, Plag et al. (2014) ao analisarem os efeitos do EF de intensidade moderada sobre a concentração de cortisol salivar em indivíduos com distúrbio do pânico, observaram que após sete meses de EF os indivíduos reduziram os níveis de cortisol salivar quando comparados aos indivíduos não exercitados. Em pacientes depressivos, foi observado que a prática de EF de intensidade moderada teve efeito antidepressivo (WILES et al., 2015). Em pacientes com distúrbios do sono também foi observado que a prática de EF de intensidade moderada por 4 meses melhorou a qualidade do sono e reduziu os níveis séricos de cortisol (PASSOS et al., 2014). Outros estudos têm mostrado que o EF também é eficiente no tratamento do estresse tanto para pessoas com peso normal (KLAPERSKI et al., 2014) ou obesas (BRUMBY et al., 2013). Diante deste contexto fica nítida a importância da realização de EF no sentido de reverter às alterações comportamentais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência do estresse crônico na imunidade humoral de ratos Wistar exercitados

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos do EF e do CVS no comportamento (teste de campo aberto e preferência por sacarose) e no peso das glândulas adrenais.

Verificar o efeito do EF e o CVS nos parâmetros relacionados ao treinamento (avaliação bioquímica, peso corporal, gordura peritoneal e do coração).

Analisar os efeitos da interação entre EF e CVS sobre o hemograma e contagem diferencial de leucócitos; peso de baço e timo e produção de anticorpos.

Investigar o efeito do sexo sobre os parâmetros analisados.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology. **Elsevier**, v. 7, p. 545, 2012.

AGUIAR, E. J. et al. Efficacy of interventions that include diet, aerobic and resistance training components for type 2 diabetes prevention: a systematic review with meta-analysis. **Int J Behav Nutr Phys Act**, v. 11, p. 2, 2014.

ANACKER, C. et al. The glucocorticoid receptor: Pivot of depression and of antidepressant treatment? **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 3, p. 415-425, 4// 2011.

ARAUJO, G. G. D. et al. Máxima Fase estável de lactato em ratos obesos de ambos os gêneros. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, p. 46-49, 2009.

AZUMA, K. et al. Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v. 37, n. 4, p. 245-53, Dec 2015.

BACHI, A. L. et al. Increased production of autoantibodies and specific antibodies in response to influenza virus vaccination in physically active older individuals. **Results Immunol**, v. 3, p. 10-6, 2013.

BARLOW, D. H.; DURAND, V. M. Abnormal Psychology: An Integrative Approach. v. 7th Edition, p. 784, 2015.

BAUER, U. E. et al. Prevention of chronic disease in the 21st century: elimination of the leading preventable causes of premature death and disability in the USA. **Lancet**, v. 384, n. 9937, p. 45-52, Jul 5 2014.

BRUMBY, S. et al. The effect of physical activity on psychological distress, cortisol and obesity: results of the Farming Fit intervention program. **BMC Public Health**, v. 13, p. 1018, 2013.

CALAIS, S. L.; ANDRADE, L. M. B. D.; LIPP, M. E. N. Diferenças de sexo e escolaridade na manifestação de Stress em adultos jovens. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 16, p. 257-263, 2003.

CAREK, P. J.; LAIBSTAIN, S. E.; CAREK, S. M. Exercise for the treatment of depression and anxiety. **Int J Psychiatry Med**, v. 41, n. 1, p. 15-28, 2011.

CARUNTU, C. et al. Stress-induced mast cell activation in glabrous and hairy skin. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 105950, 2014.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, Mar-Apr 1985.

CATTUZZO, M. T. et al. Motor competence and health related physical fitness in youth: A systematic review. **J Sci Med Sport**, Dec 12 2014.

DE ARAUJO, G. G. et al. Physiological responses during linear periodized training in rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 3, p. 839-52, Mar 2012.

DE ARAUJO, G. G. et al. Monitoring chronic physical stress using biomarkers, performance protocols and mathematical functions to identify physiological adaptations in rats. **Lab Anim**, v. 47, n. 1, p. 36-42, Jan 2013.

DHABHAR, F. S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. **Immunol Res**, v. 58, n. 2-3, p. 193-210, May 2014.

DOS REIS SILVEIRA, L.; DENADAI, B. S. Efeito modulatório de diferentes intensidades de esforço sobre a via glicolítica durante o exercício contínuo e intermitente. **Rev. paul. Educ. Fís., São Paulo**, v. 16, n. 2, p. 186-97, 2002.

EDWARDS, K. M. et al. Acute exercise enhancement of pneumococcal vaccination response: a randomised controlled trial of weaker and stronger immune response. **Vaccine**, v. 30, n. 45, p. 6389-95, Oct 5 2012.

FRICK, L. R. et al. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. **Stress**, v. 12, n. 2, p. 134-43, Mar 2009.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 6, p. 1655-62, 2013.

GAESSER, G. A.; POOLE, D. C. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exerc Sport Sci Rev**, v. 24, p. 35-71, 1996.

GHOLAMNEZHAD, Z. et al. Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. **Iran J Basic Med Sci**, v. 17, n. 1, p. 1-8, Jan 2014.

GOBINATH, A. R.; MAHMOUD, R.; GALEA, L. A. Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. **Front Neurosci**, v. 8, p. 420, 2014.

GRIFFIS, C. A. et al. Acute painful stress and inflammatory mediator production. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 3, p. 127-33, 2013.

HAMILTON, M. T.; HAMILTON, D. G.; ZDERIC, T. W. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. **Diabetes**, v. 56, n. 11, p. 2655-67, Nov 2007.

HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1423-34, Aug 2007.

HERMAN, J. P. et al. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 4, p. 292-8, Apr 2012.

HODES, G. E.; KANA, V.; MENARD, C. Neuroimmune mechanisms of depression. v. 18, n. 10, p. 1386-93, Oct 2015.

IERACI, A. et al. Physical exercise and acute restraint stress differentially modulate hippocampal brain-derived neurotrophic factor transcripts and epigenetic mechanisms in mice. **Hippocampus**, v. 25, n. 11, p. 1380-92, Nov 2015.

JIANG, P.; DANG, R. L.; LI, H. D. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. v. 2014, p. 729827, 2014.

JURASCHEK, S. P. et al. Physical fitness and hypertension in a population at risk for cardiovascular disease: the Henry Ford Exercise Testing (FIT) Project. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 6, p. e001268, Dec 2014.

KENDLER, K. S. et al. Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. **Am J Psychiatry**, v. 152, n. 6, p. 833-42, Jun 1995.

KENNEDY, S. L. et al. Splenic norepinephrine depletion following acute stress suppresses in vivo antibody response. **J Neuroimmunol**, v. 165, n. 1-2, p. 150-60, Aug 2005.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Arch Gen Psychiatry**, v. 62, n. 6, p. 617-27, Jun 2005.

KIBLER, J. L.; JOSHI, K.; MA, M. Hypertension in relation to posttraumatic stress disorder and depression in the US National Comorbidity Survey. **Behav Med**, v. 34, n. 4, p. 125-32, Winter 2009.

KLAPERSKI, S. et al. Effects of a 12-week endurance training program on the physiological response to psychosocial stress in men: a randomized controlled trial. **J Behav Med**, v. 37, n. 6, p. 1118-33, Dec 2014.

KOHUT, M. L. et al. Moderate exercise improves antibody response to influenza immunization in older adults. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2298-306, Jun 2 2004.

KRUGER, K.; MOOREN, F. C. Exercise-induced leukocyte apoptosis. **Exerc Immunol Rev**, v. 20, p. 117-34, 2014.

KVETNANSKY, R.; LU, X.; ZIEGLER, M. G. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. **Adv Pharmacol**, v. 68, p. 359-97, 2013.

LEANDRO, C. G. et al. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, p. 343-348, 2007.

LIMA, T. I. et al. Effect of exercise training on liver antioxidant enzymes in STZ-diabetic rats. **Life Sci**, v. 128, p. 64-71, May 1 2015.

LOVEDAY, A.; SHERAR, L. B. Technologies That Assess the Location of Physical Activity and Sedentary Behavior: A Systematic Review. v. 17, n. 8, p. e192, 2015.

LOWDER, T.; PADGETT, D. A.; WOODS, J. A. Moderate exercise early after influenza virus infection reduces the Th1 inflammatory response in lungs of mice. **Exerc Immunol Rev**, v. 12, p. 97-111, 2006.

LU, X. T. et al. Chronic psychological stress induces vascular inflammation in rabbits. **Stress**, v. 16, n. 1, p. 87-98, Jan 2013.

MACKINNON, L. T. Chronic exercise training effects on immune function. **Med Sci Sports Exerc**, v. 32, n. 7 Suppl, p. S369-76, Jul 2000.

MARQUES, A. H. et al. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. **Brain Res**, v. 1617, p. 28-46, Aug 18 2015.

MENESES-ECHAVEZ, J. F.; GONZALEZ-JIMENEZ, E.; RAMIREZ-VELEZ, R. Effects of supervised exercise on cancer-related fatigue in breast cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 15, p. 77, 2015.

MONTGOMERY, P.; DENNIS, J. A systematic review of non-pharmacological therapies for sleep problems in later life. **Sleep Med Rev**, v. 8, n. 1, p. 47-62, Feb 2004.

MOORE, C. J.; CUNNINGHAM, S. A. Social position, psychological stress, and obesity: a systematic review. **J Acad Nutr Diet**, v. 112, n. 4, p. 518-26, Apr 2012.

MORRIS, J. N. et al. Coronary heart-disease and physical activity of work. **Lancet**, v. 265, n. 6795, p. 1053-7; contd, Nov 21 1953.

MYERS, J. et al. Physical activity and cardiorespiratory fitness as major markers of cardiovascular risk: their independent and interwoven importance to health status. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 57, n. 4, p. 306-14, Jan-Feb 2015.

OJA, P. et al. Health benefits of different sport disciplines for adults: systematic review of observational and intervention studies with meta-analysis. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 7, p. 434-40, Apr 2015.

OLIVO, C. R. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary inflammation induced by *Streptococcus pneumoniae*. **J Appl Physiol (1985)**, v. 117, n. 9, p. 998-1007, Nov 1 2014.

PASCOE, A. R.; FIATARONE SINGH, M. A.; EDWARDS, K. M. The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans. **Brain Behav Immun**, v. 39, p. 33-41, Jul 2014.

PASSOS, G. S. et al. Exercise improves immune function, antidepressive response, and sleep quality in patients with chronic primary insomnia. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 498961, 2014.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. **Physiol Rev**, v. 88, n. 4, p. 1379-406, Oct 2008.

PERANDINI, L. A. et al. Exercise training can attenuate the inflammatory milieu in women with systemic lupus erythematosus. **J Appl Physiol (1985)**, v. 117, n. 6, p. 639-47, Sep 15 2014.

PLAG, J. et al. Effect of combined cognitive-behavioural therapy and endurance training on cortisol and salivary alpha-amylase in panic disorder. **J Psychiatr Res**, v. 58, p. 12-9, Nov 2014.

POORTMANS, J.; JEANLOZ, R. W. Quantitative immunological determination of 12 plasma proteins excreted in human urine collected before and after exercise. **J Clin Invest**, v. 47, n. 2, p. 386-93, Feb 1968.

POST, R. M. Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. **Am J Psychiatry**, v. 149, n. 8, p. 999-1010, Aug 1992.

REIHMANE, D.; DELA, F. Interleukin-6: possible biological roles during exercise. **Eur J Sport Sci**, v. 14, n. 3, p. 242-50, 2014.

REPASKY, E. A.; ENG, J.; HYLANDER, B. L. Stress, metabolism and cancer: integrated pathways contributing to immune suppression. **Cancer J**, v. 21, n. 2, p. 97-103, Mar-Apr 2015.

RETHORST, C. D.; WIPFLI, B. M.; LANDERS, D. M. The antidepressive effects of exercise: a meta-analysis of randomized trials. **Sports Med**, v. 39, n. 6, p. 491-511, 2009.

ROBLES, T. F.; GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. **Current Directions in Psychological Science**, v. 14, n. 2, p. 5, 2005.

SAHOO, S.; KHESS, C. R. Prevalence of depression, anxiety, and stress among young male adults in India: a dimensional and categorical diagnoses-based study. **J Nerv Ment Dis**, v. 198, n. 12, p. 901-4, Dec 2010.

SBARAINI, C. R.; SCHERMANN, L. B. Prevalence of childhood stress and associated factors: a study of schoolchildren in a city in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 24, n. 5, p. 1082-8, May 2008.

SCHOENFELD, T. J. et al. Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. **J Neurosci**, v. 33, n. 18, p. 7770-7, May 1 2013.

SCHUCH, F. B. Progress in the study of the effects of exercise on affective and anxiety disorders. **Front Psychiatry**, v. 5, p. 153, 2014.

SEGERSTROM, S. C.; MILLER, G. E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. **Psychol Bull**, v. 130, n. 4, p. 601-30, Jul 2004.

SHIMIZU, K. et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. **Exerc Immunol Rev**, v. 14, p. 24-37, 2008.

SIMPSON, R. J.; BOSCH, J. A. Special issue on exercise immunology: current perspectives on aging, health and extreme performance. **Brain Behav Immun**, v. 39, p. 1-7, Jul 2014.

SOLOMON, M. B.; HERMAN, J. P. Sex differences in psychopathology: of gonads, adrenals and mental illness. **Physiol Behav**, v. 97, n. 2, p. 250-8, May 25 2009.

SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 561-570, 3/14/ 2008.

STEENBERG, A. The role of IL-6 in exercise-induced immune changes and metabolism. **Exerc Immunol Rev**, v. 9, p. 40-7, 2003.

STEIN, D. J. et al. Cross-national analysis of the associations between traumatic events and suicidal behavior: findings from the WHO World Mental Health Surveys. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10574, 2010.

SWIFT, D. L. et al. The role of exercise and physical activity in weight loss and maintenance. **Prog Cardiovasc Dis**, v. 56, n. 4, p. 441-7, Jan-Feb 2014.

THOMPSON, P. D. et al. The acute versus the chronic response to exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 6 Suppl, p. S438-45; discussion S452-3, Jun 2001.

TUNG, B. T. et al. Organ and tissue-dependent effect of resveratrol and exercise on antioxidant defenses of old mice. **Aging Clin Exp Res**, v. 27, n. 6, p. 775-83, Dec 2015.

TUON, T. et al. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. **Brain Res Bull**, v. 108, p. 106-12, Sep 2014.

VAN VENROOIJ, J. A. et al. Impaired neuroendocrine and immune response to acute stress in medication-naive patients with a first episode of psychosis. **Schizophr Bull**, v. 38, n. 2, p. 272-9, Mar 2012.

VISETNOI, S. et al. Serum antibodies and cytokines in C4-deficient mice and their responses to exercise. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 27, n. 4, p. 199-206, Dec 2009.

WALEN, J. K. Does psychological stress cause diabetes? **Diabet Med**, v. 12, n. 2, p. 109-12, Feb 1995.

WARNER-SCHMIDT, J. L.; DUMAN, R. S. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 239-49, 2006.

WATERS, E. et al. Interventions for preventing obesity in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. Cd001871, 2011.

WHO. World Health Organization: Global Recommendations on Physical Activity for Health. 2010.

WILES, L.; CAFARELLA, P.; WILLIAMS, M. T. Exercise training combined with psychological interventions for people with chronic obstructive pulmonary disease. **Respirology**, v. 20, n. 1, p. 46-55, Jan 2015.

WOODS, J. A.; VIEIRA, V. J.; KEYLOCK, K. T. Exercise, inflammation, and innate immunity. **Neurol Clin**, v. 24, n. 3, p. 585-99, Aug 2006.

YAU, S. Y. et al. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 44, p. 15810-5, Nov 4 2014.

ZHAO, G. et al. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. **Exerc Immunol Rev**, v. 18, p. 98-114, 2012.

## APÊNDICE

**Apêndice A:** Artigo submetido para a revista *Physiology & Behavior*

## **Influence of chronic stress on the humoral immunity of exercised Wistar rats**

Eduardo V. Fernandes<sup>1</sup>, Lucas F. Carmona<sup>2</sup>, Mariana C.B. Ferreira<sup>2</sup>, Fabiana A. Machado<sup>3</sup>, Mara R.S. Balarin<sup>4</sup>, Solange de P. Ramos<sup>5</sup>, Celio Estanislau<sup>2</sup>, Emerson J. Venancio<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup> Department of Pathological Sciences, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>2</sup> Department of General Psychology and Behavior Analysis, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physical Education, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

<sup>5</sup> Department of Histology, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil.

**\*Author for correspondence:** Dr. Emerson José Venancio. Departamento de Ciências Patológicas/UEL. Rodovia Celso Garcia Cid (PR-445), KM 380, Campus Universitário, 86057-970, Londrina, PR, Brazil. Phone: +55 43 3371-5766. e-mail: emersonj@uel.br

### **Abstract**

Chronic stress can have immunosuppressive effects and is involved in the development of some behavioral disorders. However, physical exercise (PE) can contribute to health and resilience. In addition, the body's response to the same stressor is sex dependent. Thus, the aim of this study was to investigate the influence of chronic variable stress (CVS) on humoral immunity in exercised Wistar rats. Male and female Wistar rats were divided into four groups: Control (C); Exercise (E); Stress (S); Exercise and Stress (ES). The E and ES groups were trained at moderate intensity for six weeks. From the fourth week of the study, concomitant with the PE, the S and ES groups were subjected to CVS, a procedure that occurred daily for 19 days. To evaluate the production of antibodies (IgM, IgG2a and IgG1), all groups were immunized with chicken IgY on the 24<sup>th</sup> and 38<sup>th</sup> days of the study. In addition, behavioral, biochemical and hematological analyzes were performed. CVS led to hypertrophy of the adrenals. It was observed that PE and CVS potentiated the production of IgG1 antibodies only in male rats, when performed in isolation. Regarding behavior, in males, CVS caused a reduction in the preference for sucrose. In the variables related to training, PE prevented the rapid increase in lactate, controlled body weight and reduced peritoneal fat and cardiac hypertrophy in both males and females. It was concluded that male rats are more susceptible to CVS than females and that PE promotes morphophysiological improvements regardless of sex. In relation to immunity, both PE and CVS favored humoral immune response.

**Key-words:** immunoglobulins, differences between sexes, physical exercise and behavior.

## 1. INTRODUCTION

Stress and its consequences for health are an issue of global importance [1]. In its chronic form it has been identified as an important factor in the onset of depression [2]. In fact, stress can deregulate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA); increasing the reuptake and degradation of serotonin; increasing degradation of tryptophan; and decreasing the production of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [3-5]. Moreover, chronic stress can promote immunosuppression, affecting lymphoid organs and cells, altering the production of antibodies and cytokines, resulting from an imbalance in the activation of Th1/Th2 cells [6-10]. This occurs because chronic stress, by deregulating the HPA axis, maintains high levels of circulating cortisol. As the immune system cells have receptors for cortisol, activation of these receptors inhibits the production of inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  [11, 12], resulting in lower efficacy of the body to fight infectious disease and increasing the time taken for wound healing [13].

The imbalance caused by chronic stress on the immune system presents a strong association with the development of depression in clinical and experimental studies [14-16]. However, the effects of chronic stress on the development of depression and immune dysfunction are dependent on sex [17, 18]. Epidemiological data show that women are twice as likely as men to develop depression during their lives. The prevalence of depression in women is related to fluctuations in the sex hormones which occur in a short period of time [18]. On the other hand, a study conducted in rats showed that males were more susceptible to stress when compared to females in relation to production of specific antibodies [19]. This suggests that the higher prevalence of depression in women cannot be fully explained by a supposed higher susceptibility to stress.

Unlike chronic stress, moderate intensity physical exercise (PE), when practiced regularly, has an anti-inflammatory and immunostimulatory action, and reduces the signs and symptoms of stress [4, 5, 20-22]. Regarding behavior, Sprague-Dawley submitted rats to moderate intensity PE and demonstrated behavioral alterations consistent with a reduction in stress levels and an increase in BDNF mRNA expression [4]. A

reduction in depressive behavior was also observed in mice subjected to 14 days of voluntary running [20]. Moderate intensity PE has an anti-inflammatory action, changing the pattern of cellular immune response to humoral in rats [21]. Moreover, PE was able to reduce serum cortisol levels and stimulate neuroplasticity and serotonin production in rats [4, 5]. In elderly women, the regular practice of moderate-intensity PE stimulated the production of specific anti-influenza antibodies (IgM and IgG) compared to sedentary women [22].

Knowing that chronic stress is able to deregulate behavior and the immune system, and that moderate-intensity PE has protective effects against the alterations produced by stress, this study aimed to investigate the influence of chronic stress on the humoral immunity of exercised Wistar rats. In addition, to evaluate whether there is an effect of sex associated with the development of the symptoms of stress and immunosuppression, which influences the response to exercise.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. *Animals and experimental groups*

Male and female Wistar rats were used, of 90 days of age, from the Central Animal Laboratory at the State University of Londrina (UEL). The animals were kept in the vivarium of the Department of General Psychology and Behavioural Analysis at UEL under the following conditions: 3-5 animals per cage, light and dark cycle of 12 hours (light from 7:00 am), feed (Nuvital, Colombo, Brazil) and water provided ad libitum and temperature controlled at  $25 \pm 1$  °C.

The animals were separated by sex and randomly assigned into four groups: Control (C); Exercise (E); Stress (S) and; Exercise and Stress (ES). The groups were composed of 9 to 12 rats. All animals were subjected to the immunization procedures for evaluation of antibody production (see section 2.6). The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of UEL, case number 24606.2012.58.

### 2.2. *Physical Exercise and Chronic Stress Variable*

To perform the PE, plastic cylinders (50 cm high and 22 cm diameter) were used, containing 40 cm of water at a controlled temperature of  $31 \pm 1$ °C. The animals of the E and ES groups were subjected to swimming PE for six weeks. Each week the animals performed exercises for five days and rested for two, according to the protocol adapted from Santos Costa et al. [23].

Figure 1 shows the chronological organization of the procedures. In the first week adaptation to the PE procedure was carried out (initiated with a duration of 20 minutes and 5 minutes/day added up to 40 minutes). The intensity of the PE was controlled by means of loads tied to the thoracic region of the rats. The load was adjusted weekly, respecting the change in body weight of each animal. The use of a load began from the second week (2% of body weight in the second week, 3% in the third and 4% in the fourth, fifth and sixth weeks of the study).

On the 23<sup>rd</sup> day, the chronic variable stress protocol (CVS) was applied to the animals in the S and ES groups. CVS was performed for 19

consecutive days. The stressors used in the CVS were: cold, 1 h in the refrigerator at 4 °C; wet bedding, 12 h; social isolation, 12 h; box tilted at 45°, 12 h; overcrowded housing (individual box with 3 rats), 12 h; light on in the vivarium, 24 h, a procedure adapted from Carvalho-Netto et al. [24]. The sequence of stressors was applied by drawing lots, not using the same stressor on consecutive days to avoid familiarity. The stressor stimulus was applied after each PE session.

### *2.3. Behavioral analysis*

Two tests were used for the behavioral analyzes: the sucrose preference test and open field test. The sucrose preference test was performed on the 1<sup>st</sup> and 43<sup>rd</sup> days of the experiment (Figure 1). In this test the animals were placed individually in cages, with two similar bottles, one containing water and the other a 1% sucrose solution. After 24 hours the volume of water or 1% sucrose was determined and used to calculate the sucrose preference using the following equation:  $PS = CS \times 100 / CT$ , being that PS, preference for sucrose; CS, sucrose 1% volume consumed within 24 hours; and CT, volume of 1% sucrose solution and water consumed in the same period of time [5].

The values obtained were used to calculate the variation in preference for sucrose (VPS) according to the equation  $VPS = PS_{\text{post treatment}} - PS_{\text{pretreatment}} \times 100 / PS_{\text{pretreatment}}$ .

In the open field test the animal was placed in a 54 x 54 cm arena for 15 minutes and filmed by a camera (JVC, GZ-MG750BU model, São Paulo, Brazil) attached to the ceiling of the test room. The parameters evaluated were length of stay; distance traveled in the periphery and the center; frequency of rising behavior and; duration of grooming behavior, distinguished between the rostral and body components. This procedure was performed only once, on day 43, after the evaluation of sucrose preference (Figure 1).

#### *2.4. Biochemical Analysis*

To evaluate the levels of creatine kinase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol, triglycerides, creatinine, urea and total protein, the blood of the rats was collected through cardiac puncture in anticoagulant-free tubes on the 45<sup>th</sup> day of the experiment (Figure 1). After coagulation the samples were centrifuged at 1000 x g for 5 min. The serum was recovered, aliquoted and stored at - 20 ° C until analysis. Biochemical analyzes were performed in the biochemical analyzer Dimension<sup>®</sup> Clinical Chemistry System (SIEMENS – Munich, Germany) using commercial kits according to the manufacturer's specifications.

For measurement of blood glucose and lactate, 25 µl of blood was collected from the tail vein of the animals and stored in microtubes (1.5 ml) containing 50 µl of 1% sodium fluoride and stored at - 20 °C until analysis. The blood collection was performed on the 43<sup>rd</sup> day of the experiment, in four distinct stages: 0, before starting the test; 5, after 5 minutes of PE without load; 10, after 5 minutes of PE with a load of 4% of body weight attached to the body; 15, after 5 minutes of PE with 8% of body weight attached to the body. The total duration of the collection was 15 minutes and the loads were increased every 5 minutes.

The lactate concentrations and blood glucose were measured in a lactate and glucose electro enzymatic analyzer (YSI 2300L – Yellow Springs Instruments – Ohio, USA).

#### *2.5. Hematological Analysis*

To carry out the hematological analysis, blood was collected through cardiac puncture and stored in tubes containing 5% EDTA (day 45). Blood samples were analyzed on the same day as blood collection in an automated hematology analyzer (BC-2800 VET, Mindray, Shenzhen, China).

## *2.6. Immunization and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of immunoglobulins*

To evaluate the humoral immunity, the animals were inoculated subcutaneously (SC) with 50  $\mu$ l of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 500  $\mu$ g of aluminum hydroxide and 50  $\mu$ g of chicken IgY. Immunization was performed on the 24<sup>th</sup> and 38<sup>th</sup> day of the experiment.

To evaluate the production of IgM, IgG1 and IgG2a anti-chicken IgY antibodies, three samples of peripheral blood were obtained through cardiac puncture; prior to the first immunization (day 24), seven days after the first immunization (day 31) and seven days after the second immunization (day 45). The blood was collected in tubes containing 5% EDTA and the plasma was separated by centrifugation at 1000 x *g* for 5 min and frozen at -4 °C prior to use.

The levels of anti-IgY antibodies were determined through ELISA as described by Fernandes et al. [25] with the following modifications: plates were coated with 100  $\mu$ l of a chicken IgY solution at a concentration of 1  $\mu$ g/ml in sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. The plasma was diluted 1: 100 in PBS (pH 7.4) containing 1% skimmed milk powder (Molico®, Nestle, Aracatuba, Brazil). The dilutions of the peroxidase conjugated antibodies; anti-IgM (03-9820, Zymed, Carlsbad, USA), anti-IgG1 (A110-106P, Bethyl, Montgomery, USA) and anti-IgG2a (03-9620, Zymed, Carlsbad, USA ) were 1: 5,000, 1: 50,000 and 1: 5,000, respectively in the same buffer used for the dilution of the plasma.

## *2.7. Body and organ weight*

The weight of the animals was obtained at the beginning of each week of the experiment. At the end of the experiment the animals were euthanized and the spleen, thymus, left adrenal, heart and peritoneal fat removed and weighed. The variation in body weight of the rats was calculated by subtracting the weight at baseline from the final weight. To obtain the relative weight of the organs in relation to body weight the following equation was used: organ weight / body weight x 100.

## *2.8. Statistical Analysis*

The data were submitted to homogeneity (Levene's) and normality (Kolmogorov-Smirnov) tests. According to these tests, the ANOVA or Kruskal-Wallis test was applied, followed by a post hoc Bonferroni or Dunn's, for parametric or nonparametric data, respectively. When comparing the two independent groups, the Student t test or Mann-Whitney test were applied. To compare the antibody, lactate and glucose levels in relation to the groups and time, the ANOVA Two Way was used, followed by the Bonferroni post hoc test when differences were identified. Parametric data were presented as mean and standard deviation while nonparametric data were expressed as median and interquartile range. The minimum significance level was set at  $P < 0.05$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1 Effects of PE and CVS on parameters related to training

Table 1 shows the results of the biochemical parameters of the female and male rats. Regarding the females, the PE did not cause any biochemical alteration ( $P > 0.05$ ). However, in the males it was observed that the PE increased cholesterol in the ES group compared to the S group ( $P = 0.04$ ) and increased the total protein in the E group compared to the C group ( $P = 0.04$ ).

Figure 2 presents the lactate and glucose values from the peripheral blood of male and female rats during the incremental load test. It was observed that the PE, regardless of sex, promoted adaptations in the animals by preventing the rapid increase in lactate ( $P < 0.01$ , Figures 2a, b) and maintaining blood glucose levels ( $P < 0.01$ , Figures 2c, d) during the test.

Figure 3 presents the body weight of the peritoneal fat and heart of the male and female rats. In relation to body weight, females belonging to the E, S and ES groups presented less variation in body weight ( $P < 0.001$  vs Group C, Figure 3a). In males, this lower variation in body weight was observed only in the ES group ( $P = 0.03$  vs Group C, Figure 3b).

The PE reduced the peritoneal fat in females belonging to the E and ES groups ( $P < 0.001$  vs. Group C, Figure 3c) while, in the males, the PE only reduced the peritoneal fat in group E ( $P = 0.01$  vs. Group C, Figure 3d). In relation to the heart, the PE increased the heart weight in the females belonging to the E and ES groups ( $P < 0.01$  vs. group C, Figure 3d) and males in the E and ES groups ( $P < 0.05$  vs C and group S, Figure 3e).

#### 3.2. Effects of PE and CVS on behavior and adrenal weight

Table 2 presents the results of the open field test for females and males. In the results, no differences were found between the groups ( $P > 0.05$ ).

Figure 4 displays the results of the sucrose preference test in female and male rats. For females there were no differences between the groups ( $P > 0.05$ , Figure 4a). On the other hand, a greater preference for

sucrose was observed in the E male group compared to the males in the S group ( $P < 0.05$ , Figure 4b).

Figure 5 presents the weight of the adrenal glands of the male and female rats. For the females, there was no difference between groups ( $P > 0.05$ , Figure 5a). On the other hand, in the males, CVS increased the weight of the adrenal gland in the S group ( $P = 0.03$  vs. group C, Figure 5b).

### *3.1. The effect of PE and CVS on immunological parameters*

Table 3 presents the results of the blood count and differential leukocyte count in the peripheral blood of female and male rats. In the results, no difference was found between the groups ( $P > 0.05$ ).

Table 4 presents the spleen and thymus weights of female and male rats. In the females, the PE increased the spleen weight in the E group in relation to the C and S groups ( $P = 0.04$ ), whilst in the males, no differences were observed between the groups ( $P > 0.05$ ). Regarding the thymus, neither males nor females differed between groups ( $P > 0.05$ ).

Figure 6 shows the levels of IgM, IgG1 and IgG2a anti-IgY in the peripheral blood of male and female rats. Regarding the females, regardless of treatment, there was an increase in the production of three classes of antibodies on days 31 and 45 compared to day 24 ( $P < 0.05$ , Figures 6a, c, e), with the exception of IgG2a in the ES group which did not increase on day 31.

In relation to the production of antibodies in the males, an increase was observed, regardless of the treatment in three classes, on day 45 compared to day 24 ( $P < 0.05$ , Figures 6b, d, f). It was also observed that on day 45, the PE and CVS potentiated the production of IgG1 antibodies in the E and S groups ( $P < 0.05$  vs. group C, Figure 6d).

#### 4. DISCUSSION

The study results demonstrate that female and male animals presented similar physiological adaptations to PE. However, metabolic, immunological and behavioral parameters were influenced by the effect of PE and CVS in the male animals. The present study showed that PE and CVS did not influence the humoral immunity of the females. On the other hand, in male rats, both PE and CVS, when applied separately, potentiated the production of IgG1 anti-IgY antibodies. These results suggest that both PE and the CVS protocol favored the Th2 response after the second immunization. This effect of PE and chronic stress in inducing the Th2 response has been observed in several studies [11, 22, 25-28]. For example, mice subjected to chronic stress presented a changed pattern of Th1 response to Th2 [29]. Other studies have shown that regular physical activity, or the application of PE protocols of moderate intensity, favor the response to influenza vaccination, increasing the titers of circulating antibodies [22, 26, 28].

Besides improving the immune system, PE, when performed at moderate intensity, promotes adaptations, such as controlling body weight [30], cardiac hypertrophy [31], reduced fat [32] and increased lactate threshold [33]. Similar results were found in the rats in the present study, regardless of sex, demonstrating that the experimental protocol was effective as a training model.

Regarding behavior, PE has also been suggested as an important tool for controlling stress levels. This efficiency has been compared to pharmacological therapy and psychological interventions [34]. However, the optimal quantity and type of exercise for maximum protection are not yet known. Physically active individuals exhibit fewer health problems, even when faced with stressful situations [35], which may have consequences on behavior, such as insomnia, anxiety and depression [36]. In rats, stress has been reported to lead to a decrease in exploratory activity, reducing the preference for sugary solution and increasing the weight of the adrenals [4, 5, 37, 38], observed in male rats in the present study. Although changes in the open field test were not observed, the effects on the preference for sucrose solution and increased adrenal weight were prevented in animals subjected to PE and CVS.

The modulations of stress also influence the production of antibodies. For example, rats immunized with *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) immediately following an inescapable shock session, presented decreased production of anti-KLH antibodies (IgG and IgG2a) after 28 days of immunization [8]. Another study showed that male Wistar rats immunized with *Sheep Red Blood Cells* (SRBC) concomitant with chronic stress from a forced swim produced anti-SRBC antibodies normally (IgG and IgG2a), however, stress inhibited the production of IgG1 anti-SRBC antibodies [30]. Furthermore, it was observed that male rats were more susceptible than females to chronic restraint stress in relation to production of anti-SRBC antibodies [19]. In the present study CVS did not alter the production of IgM or IgG 2a anti-IgY antibodies. On the other hand, in male rats, CVS favored the production of IgG1 anti-IgY antibodies. A study conducted in mice subjected to chronic stress demonstrated an increase in production of Th2 cytokines, associated with weight loss and an increase in adrenal weight and corticosterone production in animals with stressed and depressive behavior [29]. As IgM and IgG2a antibodies are related to cellular immunity (Th1 pattern) and IgG1 antibodies are related to humoral immunity (Th2 pattern) [8], we can speculate that the CVS model used in the present study, like PE, also favored humoral immunity.

## 5. Conclusions

From the findings of the present study, we concluded that both PE and CVS, when performed in isolation, favored the humoral immune response of male rats. On the other hand, when PE and CVS were used concomitantly this potentiation did not occur, however, PE prevented the development of behavioral and physiological signs and symptoms of stress. The results suggest that moderate intensity PE practice is good for the organism even when submitted to chronic stress situations.

**Acknowledgment**

This work was supported by CAPES (Doctorate fellowship to EVF).

**Conflict of interest statement**

We declare that we have no conflict of interest.

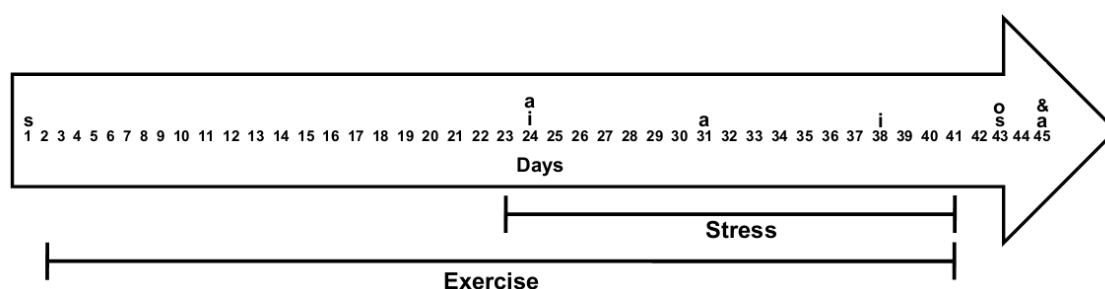
## REFERENCES

- [1] Stein DJ, Chiu WT, Hwang I, Kessler RC, Sampson N, Alonso J, et al. Cross-national analysis of the associations between traumatic events and suicidal behavior: findings from the WHO World Mental Health Surveys. *PLoS one* 2010,5:e10574. doi: 10.1371/journal.pone.0010574.
- [2] Barlow DH, Durand VM. *Abnormal Psychology: An Integrative Approach*. 7th ed. Stanford: Cengage Learning; 2015.
- [3] Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B. Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 2012,45:292-8.
- [4] Jiang P, Dang RL, Li HD. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014,2014:729827. doi: 10.1155/2014/729827.
- [5] Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X. Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines andIDO activation. *Behav Brain Res* 2013,242:110-6. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.041.
- [6] Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, et al. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009,12:134-43. doi: 10.1080/10253890802137437.
- [7] Zhao J, Liu J, Denney J, Li C, Li F, Chang F, et al. TLR2 Involved in Naive CD4+ T Cells Rescues Stress-Induced Immune Suppression by Regulating Th1/Th2 and Th17. *Neuroimmunomodulation* 2015,22:328-36. doi: 10.1159/000371468.
- [8] Kennedy SL, Nickerson M, Campisi J, Johnson JD, Smith TP, Sharkey C, et al. Splenic norepinephrine depletion following acute stress suppresses in vivo antibody response. *J Neuroimmunol* 2005,165:150-60.
- [9] Patki G, Li L, Allam F, Solanki N, Dao AT, Alkadhi K, et al. Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Behav* 2014,130:47-53. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.03.016.
- [10] Vignjevic S, Budec M, Markovic D, Dikic D, Mitrovic O, Diklic M, et al. Glucocorticoid receptor mediates the expansion of splenic late erythroid progenitors during chronic psychological stress. *J Physiol Pharmacol* 2015,66:91-100.
- [11] Hodes GE, Kana V, Menard C. Neuroimmune mechanisms of depression. *Nat Neurosci* 2015,18:1386-93. doi: 10.1038/nn.4113.
- [12] Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 2004,130:601-30.
- [13] Robles TF, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. A New Look at Chronic Stress, Depression, and Immunity. *Current Directions in Psychological Science* 2005,14:5.
- [14] Fuertig R, Azzinnari D, Bergamini G, Cathomas F, Sigrist H, Seifritz E, et al. Mouse chronic social stress increases blood and brain kynurenine

- pathway activity and fear behaviour: both effects are reversed by inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Brain Behav Immun* 2015. doi: 10.1016/j.bbi.2015.12.020.
- [15] Liu YN, Peng YL, Liu L, Wu TY, Zhang Y, Lian YJ, et al. TNFalpha mediates stress-induced depression by upregulating indoleamine 2,3-dioxygenase in a mouse model of unpredictable chronic mild stress. *Eur Cytokine Netw* 2015,26:15-25. doi: 10.1684/ecn.2015.0362.
- [16] Rawdin BJ, Mellon SH, Dhabhar FS, Epel ES, Puterman E, Su Y, et al. Dysregulated relationship of inflammation and oxidative stress in major depression. *Brain Behav Immun* 2013,31:143-52. doi: 10.1016/j.bbi.2012.11.011.
- [17] Harpaz I, Abutbul S, Nemirovsky A, Gal R, Cohen H, Monsonego A. Chronic exposure to stress predisposes to higher autoimmune susceptibility in C57BL/6 mice: glucocorticoids as a double-edged sword. *Eur J Immunol* 2013,43:758-69. doi: 10.1002/eji.201242613.
- [18] Gobinath AR, Mahmoud R, Galea LA. Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. *Front Neurosci* 2014,8:420. doi: 10.3389/fnins.2014.00420.
- [19] Baldwin DR, Wilcox ZC, Zheng G. The effects of voluntary exercise and immobilization on humoral immunity and endocrine responses in rats. *Physiol Behav* 1997,61:447-53.
- [20] Yau SY, Li A, Hoo RL, Ching YP, Christie BR, Lee TM, et al. Physical exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects are mediated by the adipocyte hormone adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014,111:15810-5. doi: 10.1073/pnas.1415219111.
- [21] Wasinski F, Gregnani MF, Ornellas FH, Bacurau AV, Camara NO, Araujo, RC, et al. Lymphocyte glucose and glutamine metabolism as targets of the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of exercise. *Mediators Inflamm* 2014,2014:326803. doi: 10.1155/2014/326803.
- [22] Bachi AL, Suguri VM, Ramos LR, Mariano M, Vaisberg M, Lopes JD. Increased production of autoantibodies and specific antibodies in response to influenza virus vaccination in physically active older individuals. *Results Immunol* 2013,3:10-6. doi: 10.1016/j.rinim.2013.01.001.
- [23] da Costa Santos VB, Ruiz RJ, Vettorato ED, Nakamura FY, Juliani LC, Polito MD, et al. Effects of chronic caffeine intake and low-intensity exercise on skeletal muscle of Wistar rats. *Exp Physiol* 2011,96:1228-38. doi: 10.1113/expphysiol.2011.060483.
- [24] Carvalho-NettoEF, Myers B, Jones K, Solomon MB, Herman JP. Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress. *Physiol Behav* 2011,104:242-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.024.
- [25] Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity. *Neurol Clin* 2006,24:585-99.
- [26] Edwards KM, Pung MA, Tomfohr LM, Ziegler MG, Campbell JP, Drayson MT, et al. Acute exercise enhancement of pneumococcal vaccination response: a randomised controlled trial of weaker and stronger immune

- response. *Vaccine*. 2012,30:6389-95. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.022.
- [27] Hou N, Zhang X, Zhao L, Zhao X, Li Z, Song T, et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2013,439:471-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.101.
- [28] Woods JA, Keylock KT, Lowder T, Vieira VJ, Zelkovich W, Dumich S, et al. Cardiovascular exercise training extends influenza vaccine seroprotection in sedentary older adults: the immune function intervention trial. *J Am Geriatr Soc* 2009,57:2183-91. doi: 10.1111/j.1532-5415.2009.02563.x.
- [29] Hou N, Zhang X, Zhao L, Zhao X, Li Z, Song T, et al. A novel chronic stress-induced shift in the Th1 to Th2 response promotes colon cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun* 2013,439:471-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.101.
- [30] Fernandes EV, Venancio EJ, Estanislau C. Evaluation of the humoral immune response of Wistar rats submitted to forced swimming and treated with fluoxetine. In: Lu RB, editor. *Effects of antidepressants, Croatia*: InTech; 2012, p1-22. doi: 10.5772/38465.
- [31] Liao J, Li Y, Zeng F, Wu Y. Regulation of mTOR Pathway in Exercise-induced Cardiac Hypertrophy. *Int J Sports Med* 2015,36:343-50. doi: 10.1055/s-0034-1395585.
- [32] Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, et al. Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol* 2015,63:174-82. doi: 10.1016/j.jhep.2015.02.022.
- [33] MacRae HS, Dennis SC, Bosch AN, Noakes TD. Effects of training on lactate production and removal during progressive exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985) 1992,72:1649-56.
- [34] Rethorst CD, Wipfli BM, Landers DM. The antidepressive effects of exercise: a meta-analysis of randomized trials. *Sports Med* 2009,39:491-511. doi: 10.2165/00007256-200939060-00004.
- [35] Marques AH, BJORKE-MONSEN AL, TEIXEIRA AL, SILVERMAN MN. Maternal stress, nutrition and physical activity: Impact on immune function, CNS development and psychopathology. *Brain Res* 2015,1617:28-46. doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.051.
- [36] Oken BS, Chamine I, Wakeland W. A systems approach to stress, stressors and resilience in humans. *Behav Brain Res* 2015,282:144-54. doi: 10.1016/j.bbr.2014.12.047.
- [37] Motaghinejad M, Motevalian M, Larijani SF, Khajehamedi Z. Protective effects of forced exercise against methylphenidate-induced anxiety, depression and cognition impairment in rat. *Adv Biomed Res* 2015,4:134. doi: 10.4103/2277-9175.161528.
- [38] Sigwalt AR, Budde H, Helmich I, Glaser V, Ghisoni K, Lanza S, et al. Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. *Neuroscience*. 2011,192:661-74. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.075.

## Figures and Tables



**Figure 1. Chronological organization of the procedures.** s, Sucrose preference test; i, Immunization; a, Blood collection; o, Open field test; &, Collection and weighing of organs.

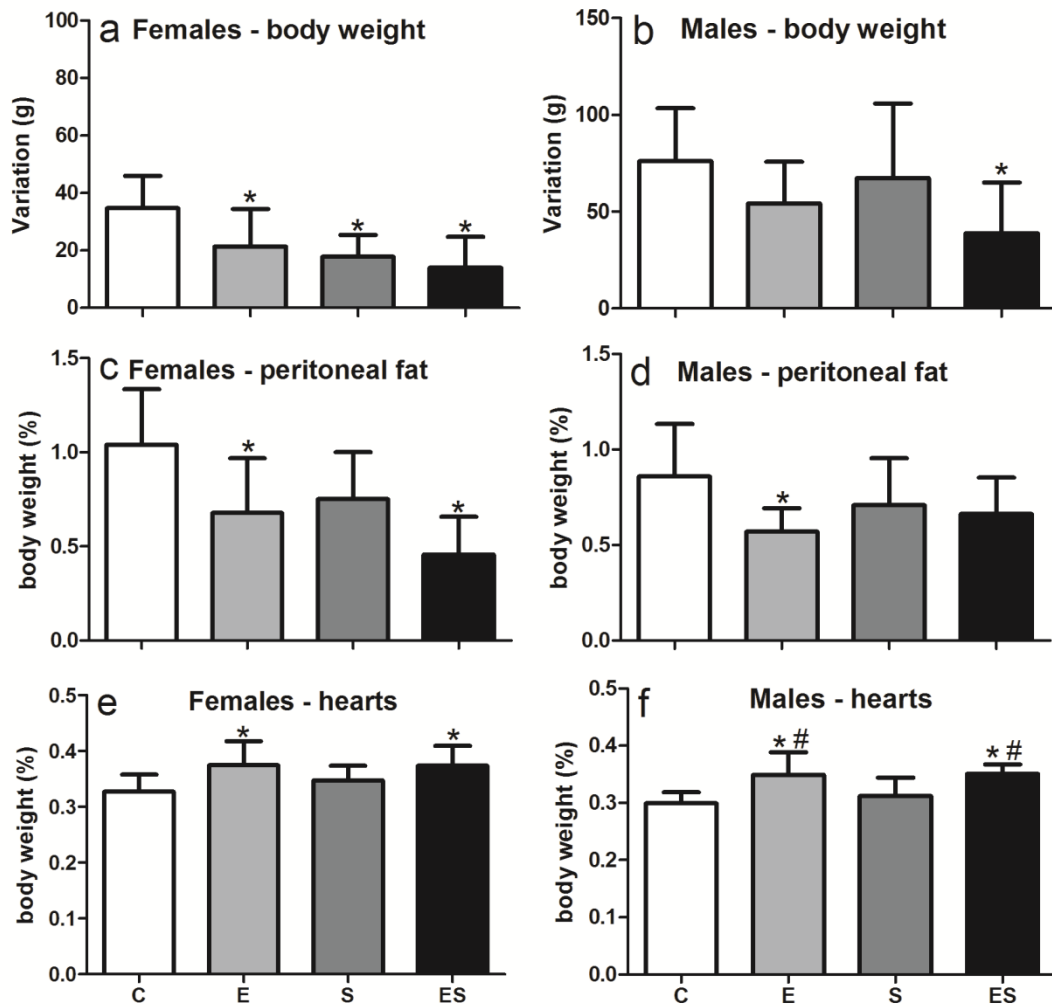
**Table 1. Biochemical parameters of the rats.**

	Females			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=11)
CK (U/L)	588.0 ± 340.0	757.2 ± 413.2	630.8 ± 418.7	613.3 ± 478.9
AST (U/L)	206.5 ± 83.5	249.7 ± 68.7	247.1 ± 56.8	215.6 ± 59.9
ALT (U/L)	49.8 ± 14.6	64.6 ± 19.0	67.5 ± 19.5	57.0 ± 13.6
CHOL (mg/dl)	74.0 ± 20.7	77.2 ± 18.2	75.7 ± 11.6	71.3 ± 11.8
TRIG (mg/dl)	88.5 ± 34.3	89.4 ± 39.0	78.1 ± 20.7	81.0 ± 29.5
Cr (mg/dl)	0.5 ± 0.12	0.6 ± 0.07	0.5 ± 0.11	0.6 ± 0.09
UREA (mg/dl)	43.9 ± 9.3	46.7 ± 6.9	46.4 ± 10.1	46.18 ± 12.5
TP (g/dl)	6.9 ± 1.4	7.6 ± 0.9	7.1 ± 1.1	6.8 ± 1.0
	Males			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=9)
CK (U/L)	966.6 ± 731.6	762.1 ± 493.3	606.6 ± 450.0	800.6 ± 609.4
AST (U/L)	248.3 ± 154.3	265.5 ± 90.2	210.8 ± 59.2	252.6 ± 109.9
ALT (U/L)	74.2 ± 45.5	73.4 ± 16.6	62.3 ± 16.2	65.8 ± 14.6
CHOL (mg/dl)	71.5 ± 19.7	77.9 ± 17.5	64.9 ± 8.2	85.4 ± 18.3 <sup>#</sup>
TRIG (mg/dl)	110.2 ± 41.5	124.0 ± 30.8	109.7 ± 36.5	151.1 ± 51.1
Cr (mg/dl)	0.5 ± 0.09	0.6 ± 0.12	0.5 ± 0.07	0.6 ± 0.11
UREA (mg/dl)	52.7 ± 8.8	55.5 ± 11.8	48.5 ± 9.3	51.4 ± 11.36
TP (g/dl)	6.4 ± 1.1	7.5 ± 1.1 <sup>*</sup>	6.7 ± 0.7	7.5 ± 0.6

C, control; E, exercise; S, stress; ES, exercise and stress. CK, Creatine kinase; AST, Aspartate aminotransferase; ALT, Alanine aminotransferase; CHOL, Cholesterol; TRIG, Triglycerides; Cr, Creatinine; TP, Total protein. Analysis performed through the ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc. Data presented as mean ± sd. \*, Different from group C; #, Different from group S; P < 0.05.



**Figure 2. Variation in the serum levels of glucose and lactate during the incremental load test.** 0, before starting the test; 5, after five minutes of PE without load; 10, after five minutes of PE with 4% of body weight attached to the body; 15, after five minutes of PE with 8% of body weight attached to the body. Analysis performed through the ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc. Data presented as mean  $\pm$  sd. \*, different from 0, in the same treatment; &, different from 5, in the same treatment.  $P < 0.05$ .

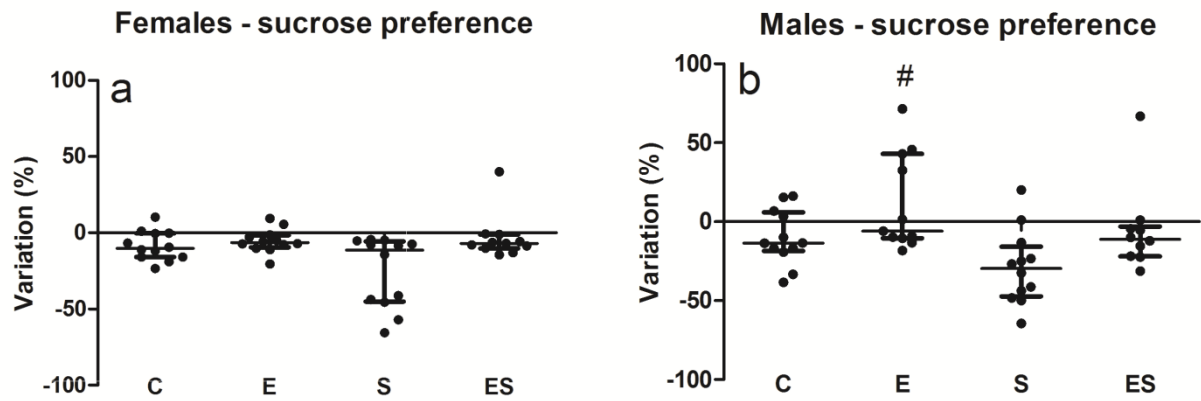


**Figure 3. Weight of the body, peritoneal fat and heart.** C, control; E, exercise; S, stress; ES, exercise and stress. Analysis performed through the ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc. Data presented as mean  $\pm$  sd. \*, different from C in the same sex; #, different from S in the same sex.  $P < 0.05$ .

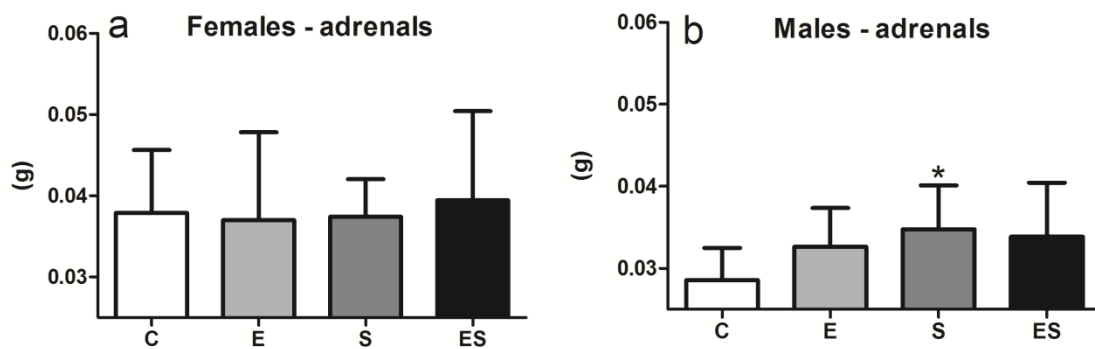
**Table 2. Behavioral evaluation through the open field test.**

<b>Females</b>				
	<b>C (n=12)</b>	<b>E (n=12)</b>	<b>S (n=12)</b>	<b>ES (n=11)</b>
TSP (s)	868 (829 - 878)	863 (857 - 886)	878 (860 - 887)	879 (861 - 888)
TSC (s)	41.4 ± 31.3	35.9 ± 23.7	26.2 ± 20.2	24.8 ± 14.6
SC	186.5 ± 53.6	195.7 ± 52.5	231.3 ± 67.7	171.3 ± 57.3
UPPF	43 (37 - 53)	44 (28 - 60)	53 (34 - 89)	56 (34 - 66)
UPCF	2.0 (1.0 - 3.0)	2.0 (1.0 - 5.0)	2.0 (1.2 - 5.5)	2.0 (1.0 - 4.0)
RG (s)	37.2 ± 23.4	44.9 ± 29.1	55.8 ± 43.9	63.2 ± 32.3
BG (s)	11.0 (3.9 - 15.7)	7.5 (4.3 - 46.6)	11.3 (3.3 - 44.8)	25.5 (10.5 - 63.5)
RBG (s)	48.5 ± 27.6	66.8 ± 47.1	76.8 ± 56.6	100.3 ± 54.0
<b>Males</b>				
	<b>C (n=12)</b>	<b>E (n=12)</b>	<b>S (n=12)</b>	<b>ES (n=9)</b>
TSP (s)	877 (855 - 887)	873 (825 - 881)	891 (862 - 897)	877 (826 - 887)
TSC (s)	29.7 ± 19.4	49.5 ± 46.1	18.3 ± 18.7	44.1 ± 51.6
SC	102.8 ± 36.1	124.8 ± 42.5	135.6 ± 51.1	149.7 ± 64.8
UPPF	39 (25 - 46)	49 (38 - 57)	41 (29 - 55)	35 (26 - 58)
UPCF	1.5 (0.0 - 4.2)	2.0 (1.0 - 3.7)	0.0 (0.0 - 3.7)	1.0 (0.0 - 5.5)
RG (s)	58.2 ± 24.8	85.4 ± 33.8	57.8 ± 42.0	58.5 ± 29.9
BG (s)	10.7 (5.2 - 27.3)	20.8 (8.6 - 29.3)	4.8 (1.5 - 37.5)	20.0 (12.8 - 59.1)
RBG (s)	73.7 ± 36.7	109.9 ± 49.9	75.1 ± 61.1	87.3 ± 53.5

C, control; E, exercise; E, stress; ES, exercise and stress. TSP, time spent in the periphery; TSC, time spent in the center; SC, squares crossed; UPPF, upright posture periphery frequency; UPCF, upright posture center frequency; RG, rostral grooming; BG, body grooming; RBG, rostral+body grooming. (s), seconds. Parametric data were analyzed using ANOVA presented as mean ± sd; nonparametric data were analyzed using Kruskal-Wallis and presented as median and inter quartile range (25-75%). P > 0.05.



**Figure 4. Effect of PE on sucrose preference in control rats and those submitted to CVS.** C, control; E, exercise; E, stress; ES, exercise and stress. #, different from the S males. Analyzes performed through the Kruskal-Wallis followed by the Dunn's post hoc test. Data presented as median and inter quartile range (25-75%).  $P < .05$ .



**Figure 5. Total adrenal weight.** C, control; E, exercise; S, stress; ES, exercise and stress. \*, different from the C males. Analysis performed through ANOVA followed by Bonferroni post hoc. Data presented as mean  $\pm$  sd.  $P < 0.05$ .

**Table 3. Blood count and differential leukocyte count.**

	<b>Females</b>			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=11)
Red blood cells ( $\times 10^6 \text{mm}^3$ )	6.5 $\pm$ 0.3	6.5 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.7	6.8 $\pm$ 0.8
Hemoglobin (g/dl)	12.1 $\pm$ 1.3	11.8 $\pm$ 1.2	11.7 $\pm$ 1.4	12.2 $\pm$ 2.1
Hematocrit (%)	42.3 $\pm$ 3.4	43.4 $\pm$ 5.7	40.9 $\pm$ 5.3	46.2 $\pm$ 7.3
Leukocytes ( $\text{mm}^3$ )	8558 $\pm$ 4558	7971 $\pm$ 3549	8396 $\pm$ 4733	9200 $\pm$ 4952
Neutrophils ( $\text{mm}^3$ )	2796 $\pm$ 1501	2392 $\pm$ 1816	2361 $\pm$ 1236	2717 $\pm$ 2400
Eosinophils ( $\text{mm}^3$ )	25 (0 – 98)	29 (0 – 244)	73 (0 – 221)	96 (0 – 153)
Platelets ( $\times 10^5 \text{mm}^3$ )	6.9 (4.9 - 7.2)	5.8 (4.9 - 6.9)	5.8 (5.0 – 6.6)	6.9 (6.0 – 7.1)
Lymphocytes ( $\text{mm}^3$ )	5678 $\pm$ 3185	5480 $\pm$ 2310	5870 $\pm$ 4082	6479 $\pm$ 2629

	<b>Males</b>			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=12)
Red blood cells ( $\times 10^6 \text{mm}^3$ )	7.1 $\pm$ 0.6	7.3 $\pm$ 0.9	7.2 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.3
Hemoglobin (g/dl)	12.7 $\pm$ 1.8	13.0 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 0.9	13.5 $\pm$ 1.2
Hematocrit (%)	44.5 $\pm$ 4.4	46.7 $\pm$ 7.8	46.3 $\pm$ 2.9	46.5 $\pm$ 3.0
Leukocytes ( $\text{mm}^3$ )	9129 $\pm$ 4632	9317 $\pm$ 6447	9455 $\pm$ 3985	9383 $\pm$ 2594
Neutrophils ( $\text{mm}^3$ )	3464 $\pm$ 4211	3492 $\pm$ 2238	2477 $\pm$ 1560	2522 $\pm$ 1536
Eosinophils ( $\text{mm}^3$ )	0 (0 – 62)	0 (0 – 81)	107 (73 – 180)	0 (102 – 265)
Platelets ( $\times 10^5 \text{mm}^3$ )	6.2 (5.7 - 8.0)	6.3 (5.1 – 7.9)	6.0 (5.2 - 8.0)	7.2 (6.1 – 7.9)
Lymphocytes ( $\text{mm}^3$ )	5619 $\pm$ 2048	5722 $\pm$ 5369	5870 $\pm$ 4082	6651 $\pm$ 1817

C, control; E, exercise; S, stress; ES, exercise and stress. Parametric data were analyzed by ANOVA and expressed as mean  $\pm$  sd; nonparametric data were analyzed using Kruskal-Wallis and presented as median and inter quartile range.  $P > 0.05$ .

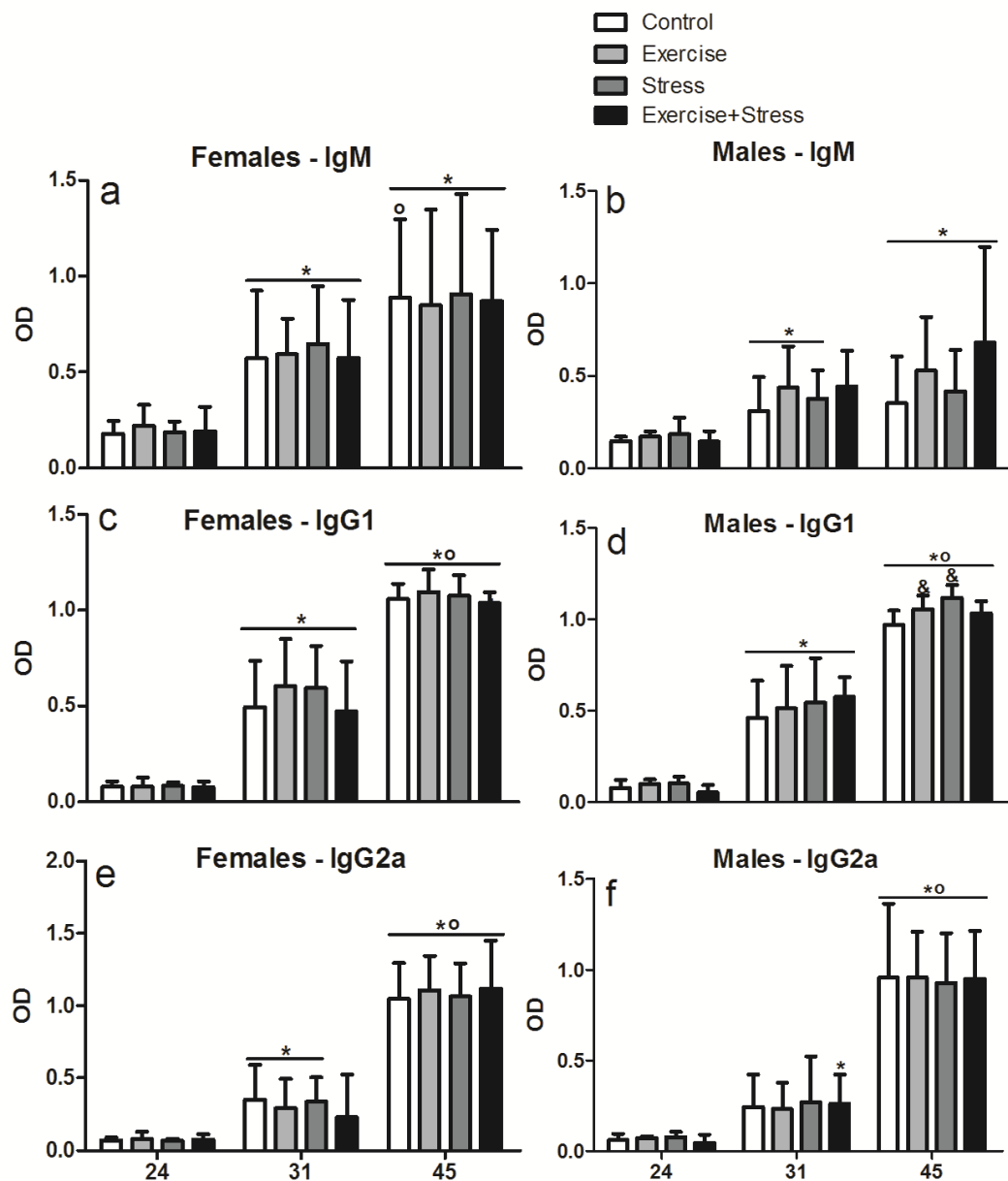
**Table 4. Spleen and thymus weight.**

	<b>Females</b>			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=11)
Spleen (% body weight)	0.14 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>*#</sup>	0.14 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02
Thymus (% body weight)	0.05 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.00

	<b>Males</b>			
	C (n=12)	E (n=12)	S (n=12)	ES (n=9)
Spleen (% body weight)	0.12 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.02
Thymus (% body weight)	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01

C, control; E, exercise; S, stress; ES, exercise and stress. Analysis performed through ANOVA followed by Bonferroni post hoc. Data presented as mean  $\pm$  sd. \*, Different from the C group; #, Different from the S group.  $P < 0.05$ .



**Figure 6. The influence of PE and CVS on the production of anti-IgY antibodies.** 24, day twenty-four of the experiment; 31, day thirty-one; 45, day forty-five. \*, different from day 24 in the same treatment; °, different from day 31 in the same treatment; &, different from the control on day 45. ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc. Data presented as mean  $\pm$  sd.  $P < 0.05$ .

#### 4. CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que o estresse crônico variável altera o comportamento e a massa das glândulas adrenais nos ratos machos, condição essa revertida pelo exercício físico de intensidade moderada. Além de prevenir os efeitos do estresse crônico, o exercício físico de intensidade moderada melhora o limiar de lactato, previne o aumento da massa corporal, reduz a gordura peritoneal e aumenta a massa cardíaca nos animais de ambos os sexos.

Nas análises hematológicas e no peso do baço, não há efeito do exercício físico de intensidade moderada e do estresse crônico variável. A massa do timo aumenta nas fêmeas exercitadas e a produção de anticorpos IgG1 anti-IgY aumenta após a segunda imunização apenas nos ratos machos submetidos ao exercício físico de intensidade moderada ou ao estresse crônico variável, condição essa que é revertida quando os animais são submetidos ao exercício físico de intensidade moderada e ao estresse crônico variável.

Os resultados sugerem que o exercício físico utilizado no presente estudo, além de promover melhorias fisiológicas, também preveniu os efeitos do estresse crônico. Dessa forma, a prática regular de exercícios físicos de intensidade moderada pode ser considerada uma estratégia não medicamentosa para manter a homeostasia comportamental e promover melhorias fisiológicas nos indivíduos. Estudos futuros são necessários para a investigação dessa hipótese.