



Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória



Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica
- PPGNAFPF

Diógenis Barbosa de Moura

**Efeito do exercício moderado sobre a morfologia do baço e timo de ratos que
sofreram desnutrição proteica perinatal**

Vitória de Santo Antão

2017



Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória



Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica
- PPGNAFPF

Diógenis Barbosa de Moura

**Efeito do exercício moderado sobre a morfologia do baço e timo de ratos que
sofreram desnutrição proteica perinatal**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Nutrição,
Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica, área de concentração em
Bases experimentais e clínicas da
plasticidade fenotípica, para a
obtenção do título de mestre.

Orientador: José Candido Ferraz de Souza

Coorientadora: Carol Virgínia Góis Leandro

Vitória de Santo Antão

2017

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Giane da Paz Ferreira Silva, CRB-4/977

M929f Moura, Diógenis Barbosa.

Efeito do exercício moderado sobre a morfologia do baço e timo de ratos que sofreram desnutrição proteica perinatal /Diógenis Barbosa Moura. _ Vitória de Santo Antão, 2017.

44 folhas.

Orientador: José Candido Ferraz de Souza
Coorientadora: Carol Virgínia Góis Leandro

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica 2016.

Inclui bibliografia.

1. Plasticidade fenotípica. 2. Exercício físico. 3. Desnutrição. I. Souza, José Candido Ferraz (Orientador). II. Leandro, Carol Virgínia Góis. III. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-058/2017



Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória



Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica
- PPGNAFPF

Dissertação de mestrado apresentada por **DIÓGENIS BARBOSA DE MOURA** ao programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título **“Efeito do treinamento moderado sobre a morfologia do baço e timo de ratos adultos que sofreram desnutrição proteica perinatal”**, orientada pelo Prof. Dr. José Cândido Ferraz de Souza Júnior e coorientada pela Prof. Dr. Carol Virginia Gois Leandro, aprovada no dia 03 de março de 2016 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr.^a Wylla Tatiana Ferreira e Silva
Núcleo de Nutrição ã CAV/UFPE

Dr. José Antônio dos Santos
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte ã CAV/UFPE

Dr. José Luiz de Brito Alves
Núcleo de Nutrição ã UFPB

AUTOR:

Diógenis Barbosa de Moura

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Cândido, que desde a graduação aceitou o desafio de me orientar, sempre com muita sensatez, calma, paciência, amizade e infinitas doses de bons ensinamentos.

À minha coorientadora, Carol, que está junto comigo desde o segundo período da graduação, por tentar compartilhar seus conhecimentos, pela amizade, paciência, por sempre tentar me ajudar da melhor forma possível, pelas reclamações e pelos elogios, por todas as oportunidades dadas a mim durante esses cinco anos de trabalho. Espero ter aprendido muito com a convivência. Espero, também, aprender muito mais, para que um dia tenha um pouco de sua competência.

À Sueli, pois sem seu esforço e dedicação esse trabalho não teria acontecido. Preciso te agradecer por todo o seu conhecimento de vida e de bancada divididos comigo, com muita calma e serenidade.

Ao professor Francisco Amanajás por ter me recebido tão abertamente em seu laboratório, e pela sua disponibilidade.

Ao professor Yves Tournier pelo auxílio sempre disponível, independente da distância

À minha mãe, Rosilda, e aos meus avós Cícero e Mirian por serem a base de tudo. Sem eles, eu certamente não teria chegado a lugar algum.

À minha tia Eliana, por ser sempre chata, mas me incentivar sempre. Obrigado por desde pequeno acreditar mais em mim que eu mesmo.

À Talita por dividir sua vida comigo. Pela companhia nos bons e maus momentos. Por suportar minha ausência em alguns momentos, pela sua presença em outros, por aguentar meus estresses, reclamações e meus dias de mau humor, enfim, por estar ao meu lado, independente de qualquer motivo.

A Tozi, Raiza e Jean por suportarem minha ausência, mas sempre me receberem com muita alegria.

A Rodrigo, André, Lu, Isabele e Gabi, que tornaram o tempo de mestrado mais leve. A amizade de vocês foi uma das grandes aquisições minha na pós-graduação.

A David, Diorginis e Zé pela parceria, convivência diária e pelos ensinamentos compartilhados. Por Gena nos dias de angústia.

A Daillo pela companhia durante os experimentos, obrigado por dividir o trabalho comigo, bem como a alegria do dia de rodar a estatística e a tristeza de um dia todo em frente ao microscópio.

Aos meus amigos por suportarem a distância, a ausência, mas sempre me receberem como se apenas algumas horas do último encontro tivesse se passado.

Aos animais necessários nesse experimento. A vida de vocês, infelizmente, se foi, mas as contribuições para a ciência vão os tornar imortais.

À UFPE, por desde meus 18 anos estar presente na minha vida, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

À CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

A Deus por ser um apoio do início ao fim desse período.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

C	Grupo controle
EF	Exercício físico
LPS	Lipopolissacarídeo
LP	Grupo desnutrido
M	Zona medular
N	Tecido não linfóide
O	Zona cortical
SE	Erro padrão da média
SI	Sistema imune
T	Grupo treinado

RESUMO

A restrição proteica materna é um indutor bem conhecido de adaptações fisiológicas de curto e longo prazo. Estas adaptações não são determinísticas e podem ser moduladas pelo treinamento físico (T). Avaliou-se os efeitos de um treinamento físico moderado sobre as alterações induzidas pela restrição proteica perinatal na morfometria do timo e baço de ratos endotoxêmicos. Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos de acordo com a dieta da mãe durante a gestação e lactação, controle (C, 17% caseína) e subnutridos (dieta baixa em proteína, LP, 8% caseína). No 63º dia pós-natal, os animais foram submetidos a treinamento físico moderado (8 semanas, 5 d/sem, 60 min.d-1, a 70% do VO₂máx). Após o período de treinamento físico, metade de cada grupo recebeu uma injeção de lipopolissacarídeo (LPS) ou soro fisiológico. A morfologia do timo e baço foi analisada. O nível de organização da polpa esplênica branca foi descrito como percentual. Os filhotes LP mostraram uma contagem celular total reduzida tanto no córtex do timo como na celularidade do bulbo quando comparados aos filhotes C. A morfologia do timo foi semelhante entre os grupos, mesmo sob os efeitos de LPS. Os filhotes LP apresentaram redução da área marginal da zona quando comparados ao grupo C. Na área dos folículos esplênicos, todos os grupos apresentaram aumento em relação ao controle. Essas mudanças não foram observadas no grupo LP + T. LP mostrou alta porcentagem de lâminas desorganizadas da polpa branca esplênica. Essas alterações foram atenuadas em animais treinados. O treinamento físico atenua o efeito da programação nutricional sobre a morfometria do timo e baço em ratos adultos. Nossos resultados suportam a hipótese de que o estímulo ambiental positivo, como o treinamento físico moderado, pode modular um organismo programado pela desnutrição perinatal.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica. Exercício físico. Tecido linfóide. Restrição protéica. Ratos.

ABSTRACT

Maternal protein restriction is a well-known inducer of short and long-term physiological adaptations. These adaptations are not deterministic and can be modulated by physical training (T). The effects of a moderate physical training on the low-protein-induced changes on morphometry of thymus and spleen of endotoxemic rats were evaluated. Male Wistar rats were divided into two groups according to their mother's diet during gestation and lactation, control (C, 17% casein) and, undernourished (Low-protein diet, LP, 8% casein). At the 63th day post-natal, animals were submitted to moderate physical training (8 wk, 5 d.wk⁻¹, 60 min.d⁻¹, at 70% of VO_{2max}) or not. After physical training period, half of each group received an injection of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. The morphology of the thymus and spleen was analyzed. The level of organization of the white splenic pulp was described as percentage. LP pups showed a reduced total cell count in both thymus cortex and medulla cellularity when compared to C pups. The morphology of the thymus was similar among groups, even under the effects of LPS. LP pups showed a reduction of the zone marginal area when compared to C group. In the splenic follicles area, all groups presented an increase when compared to control. These changes were not seen in the LP + T group. LP group showed a high percentage of disorganized slides from splenic white-pulp. Those alterations were attenuated in trained animals. Physical training attenuates the effect of nutritional programming on the morphometry of the thymus and spleen in adult rats. Our findings supports the hypothesis that positive environmental stimulus, such as moderate physical training, can modulate a programmed organism by perinatal undernutrition.

Key-words: Phenotypic plasticity. Physical exercise. lymphoid tissue. Protein restriction. Rats.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	10
2. HIPÓTESE	13
3. OBJETIVO	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Animais e dieta.....	15
4.2 Protocolo de treinamento físico moderado.....	17
4.3 <i>Remoção do timo e baço e processo histológico</i>	18
4.4 Análise estatística.....	20
5. ARTIGO.....	21
5.2 Material and Methods.....	24
5.2.1 <i>Animals and Diet</i>	24
5.2.2 <i>Protocol of Moderate Physical Training Protocol</i>	25
5.3 Statistical Analysis	27
5.4 Results.....	27
5.5 Discussion	29
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
7. REFERÊNCIAS	38
8. ANEXOS.....	44

1. REVISÃO DE LITERATURA

A soma de diversos fatores, tais como rápido aumento da tecnologia, globalização, e recentes práticas da indústria alimentar têm trabalhado em conjunto para o aparecimento do fenômeno da transição nutricional em todo o mundo (POPKIN, 2011). Já no Brasil, a partir da década de 90, todo o país começou a experimentar o processo de transição nutricional (BATISTA FILHO ; RISSIN, 2003; BATISTA FILHO *et al.*, 2008), que se caracteriza pela saída da prevalência da desnutrição energético-protéica, expressando-se em uma baixa-estatura, para um aumento da deficiência de micro nutrientes, caracterizando com o aumento da obesidade (BATISTA FILHO *et al.*, 2008). Quando a desnutrição acontece em períodos críticos do desenvolvimento, mesmo com posterior recuperação, pode haver mudanças permanentes na estrutura e função dos tecidos (LUCAS, 1991).

Como consequência da desnutrição, crianças revelam alterações nas contagens totais de células do sistema imune (SI), por exemplo, aumento no total de linfócitos na circulação sanguínea, porém com diminuição do total de linfócitos T na infecção aguda (RYTTER *et al.*, 2014). Também em crianças, há alterações morfológicas e funcionais nos órgãos linfóides em decorrência da desnutrição. Em crianças desnutridas, o timo tende a ser menor que em indivíduos eutróficos, no entanto, o tamanho tímico tende a ser recuperado assim que houver recuperação nutricional (CHEVALIER *et al.*, 1995; PRENTICE, 1999; NASSAR *et al.*, 2007; RYTTER *et al.*, 2014). Ainda no timo, a desnutrição pode causar alterações em subpopulações celulares, com diminuição de células T disponíveis nos sistemas periféricos (SAVINO, 2002; SAVINO *et al.*, 2007; MARIA SUSANA *et al.*, 2014). Tais alterações podem ter consequências negativas na competência imune dos indivíduos expostos à desnutrição (SAVINO *et al.*, 2007).

O baço é um órgão linfóide secundário, responsável pela captação de antígenos, visando a estimulação linfocitária. Além disso, é importante no início da resposta imune inata, e um dos centros do corpo responsáveis pela resposta ao Lipopolissacarídeo (LPS), um açúcar presente apenas em bactérias gram-negativas (ALTAMURA *et al.*, 2001; KESTEMAN *et al.*, 2008). Frente à desnutrição, o baço apresenta redução da zona marginal e redução do número de folículos

linfóides(MOITA *et al.*, 2011). Mello e colaboradores (2014) observaram que animais expostos a desnutrição proteica apresentavam celularidade esplênica reduzida, com uma redução na contagem de células, particularmente na população de linfócitos. Observou-se também uma diferença significativa da espessura da cápsula do baço nos animais desnutridos (MELLO *et al.*, 2014)

Quando a desnutrição ocorre em períodos tidos como críticos do desenvolvimento, seus efeitos podem se refletir durante a vida adulta dos indivíduos, pois promove mudanças estruturais e fisiológicas que necessitam de adaptações orgânicas e metabólicas(WELLS, 2013). No SI de ratos, insultos nutricionais durante a gestação e a lactação induz a alteração na estrutura e no desenvolvimento da resposta imune, além de aumentar a susceptibilidade à infecção (FERREIRA-E-SILVA *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2010; SENNA *et al.*, 2015). A base teórica que explica a relação entre o ambiente e o aparecimento de doenças futuras intitula-se plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 2005), onde alterações ambientais podem levar a uma alteração do fenótipoexpresso(WEST-EBERHARD, 2003; KUCHARSKI *et al.*, 2008). No entanto, as alterações fenotípicas podem não ter características determinísticas, sendo assim, alterações ambientais podem modular os efeitos de um insulto durante períodos críticos do desenvolvimento. É nesse contexto que surge o exercício físico como agente ambiental modulador (LEANDRO *et al.*, 2009; MOITA *et al.*, 2011; LEANDRO *et al.*, 2012; FIDALGO *et al.*, 2013; SENNA *et al.*, 2015).

O exercício físico (EF) é caracterizado por uma atividade física realizada de maneira sistemática, e pode ser caracterizado a partir do consumo máximo de oxigênio durante sua prática, podendo ser classificado em leve, moderado e intenso (LEANDRO *et al.*, 2009). O EF é associado a benefícios para a saúde dos indivíduos, particularmente o de intensidade moderada (50~70% consumo máximo de oxigênio) (NIEMAN *et al.*, 1990; MATTHEWS *et al.*, 2002; LEANDRO *et al.*, 2009)

Os primeiros estudos correlacionando a intensidade do exercício físico com o sistema imune observaram a prevalênciade infecções do trato respiratório superior em atletas (NIEMAN *et al.*, 1990; HEATH *et al.*, 1991; NIEMAN, 1994).Tais estudos propuseram o modelo da *U* curve(NIEMAN, 1994), sendo esse, proposto para ilustrar a resposta imunitária às diferentes intensidades do exercício .Assumimos,

então, que o EF moderado é o que garante maior proteção contra infecções e melhor imunocompetência(LEANDRO *et al.*, 2002; MATTHEWS *et al.*, 2002; ROSA ;VAISBERG, 2002).Os mecanismos envolvidos sugerem uma integração neurológica e endócrina com o SI, onde as células imunes respondem aos hormônios secretados pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal durante as diferentes fases do estresse gerado pelo EF (ROSA; VAISBERG, 2002; ENGELAND *et al.*, 2016). Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que quando a privação nutricional acontece durante os períodos críticos do desenvolvimento, seus efeitos no SI podem persistir mesmo após o desenvolvimento completo do sistema. No entanto, o EF pode ser capaz de modular tais efeitos(MOITA, *et al.*, 2011; SENNA *et al.*, 2015; SENNA *et al.*, 2015) Demonstramos, por exemplo, que o exercício treinamento físico moderado (75% do VO2 máx, 5 vezes por semana, durante 8 semanas) atenuou os efeitos de uma dieta perinatal de baixa proteína sobre os subconjuntos de linfócitos no sangue e a morfologia do baço(MOITA *et al.*, 2011). Mais recentemente, foi demonstrado que o treinamento físico moderado atenuou os efeitos de uma restrição protéica perinatal sobre a população de linfócitos do baço, reduzindo a apoptose em prole treinado, apesar da exposição aos desafios nutricionais e imunológicas perinatais adversos ao longo da vida (SENNA *et al.*, 2015).

Mesmo com muitos trabalhos apontando tendências de como pode se comportar os tecidos linfóides frente a um estímulo nutricional, pouco se sabe sobre a morfologia desses tecidos em ratos adultos que foram submetidos à desnutrição proteica perinatal. Dado o papel central do timo e do baço no desenvolvimento imunológico, entender como eles podem ser afetados pela desnutrição materna na vida fetal e pós-natal precoce, e o impacto a longo prazo torna-se importante. Logo após descoberto tais efeitos, encontrar maneiras de como evitar os efeitos deletérios desses insultos é um passo importante, a fim de evitar a morbi-mortalidade e os gastos com saúde pública.

Tento como base os argumentos supracitados, objetivamos avaliar os efeitos do exercício físico moderado sobre a morfologia do baço e do timo de ratos que sofreram desnutrição proteica perinatal.

2. HIPÓTESE

O treinamento físico moderado atenua os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a morfologia do timo e do baço em ratos Wistar adultos endotoxêmico.

3. OBJETIVO

Avaliar os efeitos do treinamento físico moderado sobre a morfologia do baço e do timo e a celularidade tímica de ratos que sofreram desnutrição protéica perinatal, submetidos a um desafio endotoxêmico

4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências Biológicas (protocolo nº. 23076,021093 / 2011-99), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. Seguiu-se as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório.

4.1 Animais e dieta

Ratas grávidas foram divididas em dois grupos, de acordo com o tipo de dieta (n = 9 / cada): grupo controle(C), com uma dieta de 17% da dieta caseína e grupo desnutridas (LP) alimentadas com uma dieta de 8% de proteína(REEVES *et al.*, 1993). (tabela 1)

No dia pós-natal 1, as ninhadas foram reduzidas a 8 filhotes por mãe , priorizando-se machos na ninhada. A partir do desmame (idade de 25 dias), os filhotes receberam ração padrão para roedores Labina® (Purina Brasil), mantido até ao final dos experimentos. No dia 63 depois do nascimento, os filhotes foram divididos em quatro grupos de acordo com o treinamento físico: controle sedentário (C, n = 16), dieta de baixa proteína e sedentário (LP, n = 16), controle e submetidos a treinamento (T, n = 16), e dieta de baixa proteína e submetidos a treinamento (LP + T, n = 16). Os ratos treinados foram exercitados em esteira ergométrica por um período de 8 semanas (5 dias/semana, 60 min/dia, a 70% VO_{2max}) (LEANDRO *et al.*, 2007).

Após 24 horas da última sessão de exercício, metade do número de ratos em cada grupo receberam uma injeção de lipopolissacárido (LPS) (1 mg / mL / kg ; E. coli sorotipo 0111: B4, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) ou água destilada (AD) [1 ml / kg, ip]. Mais quatro outros grupos foram então formado: controle, sedentário e AD (C, n = 8), controle, sedentário e LPS (C + LPS, n = 8), Desnutrido, sedentário e AD (LP, n = 8), desnutrido, sedentário e LPS (LP + LPS, n = 8), treinados e AD (T, n = 8), treinados e LPS (T + LPS, n = 8), desnutrido, treinados e AD (LP + T, n = 8), e

desnutrido, treinados e LPS (LP + T + LPS, n = 8). Após 24 horas da injeção de LPS, os ratos foram decapitados para coleta do timo e do baço.

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (à base de proteína 17% e 8%).

Ingredientes	LP	Controle
Proteína,g	79.3	179.3
Mix vitamínico*, g	10.0	10.0
Mix mineral**, g	35.0	35.0
Celulose, g	50.0	50.0
Bitartarato de colina, g	2.5	2.5
D-Metionina, g	3.0	3.0
Óleo de soja, mL	70.0	70.0
Amido de milho, g	750.2	750.2
Sacarose, g	100.0	100.0
TBHT, g	0,014	0,014
Total	1000 g	1000 g

*Fonte:*Reeves, 1993

*Conteúdo da mistura de Vitaminas (mg/kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0.125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0.1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; p-ácidoaminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

** Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₂, 120; FeSO₄·7H₂O, 200; elementos traços, 400 (MnSO₄·H₂O, 98; CuSO₄·5H₂O, 20; ZnSO₄·7H₂O, 80; CoSO₄·7H₂O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40g [per kg de dieta]).

TBHT ñ hidroxitoluenobutilado.

4.2 Protocolo de treinamento físico moderado

O protocolo de treino físico foi realizado de acordo com um estudo anterior (LEANDRO *et al.*, 2007) (Tabela 2). Resumidamente, os ratos correram em uma esteira (EP-131®, o Insight Equipments, SP, Brasil), durante 8 semanas (5 dias/semana, 60 min/dia). O protocolo foi dividido em quatro estágios progressivos em cada sessão: (I) aquecimento (5 minutos); (II) intermediário (20 minutos); (III) formação (30 minutos), e (IV) desaceleração (5 minutos). A porcentagem de VO₂max durante as sessões de treinamento foi mantido em torno de 65 - 70%; o exercício foi classificada como aeróbico de intensidade moderada de esforço. O grupo não-treinado permaneceu em suas gaiolas.

Tabela 2. . Protocolo de treinamento físico moderado em esteira para ratos Wistar adultos.

Semanas	Velocidade (km/h)	Inclinação (°)	Duração (min)
1ª Semana (Adaptação)	0,3	0	5
	0,4	0	5
	0,5	0	5
	0,3	0	5
2ª Semana	0,4	0	5
	0,5	0	20
	0,6	0	30
	0,4	0	5
3ª Semana	0,5	0	5
	0,6	0	10
	0,8	0	10
	0,9	0	30
	0,5	0	5
4ª Semana	0,5	0	5
	0,8	0	10
	0,9	0	10
	1,1	0	30
	0,5	0	5
5ª Semana	0,5	5	5
	0,8	5	10
	0,9	5	10
	1,1	5	30
	0,5	0	5
6ª Semana	0,5	10	5
	0,8	10	10
	0,9	10	10
	1,1	10	30
	0,5	0	5
7ª Semana	0,5	10	5
	0,8	10	10
	0,9	10	10
	1,1	10	30
	0,5	0	5
8ª Semana	0,5	10	5
	0,8	10	10
	0,9	10	10
	1,1	10	30
	0,5	0	5

Fonte: Leandro, 2007

4.3 Remoção do timo e baço e processo histológico

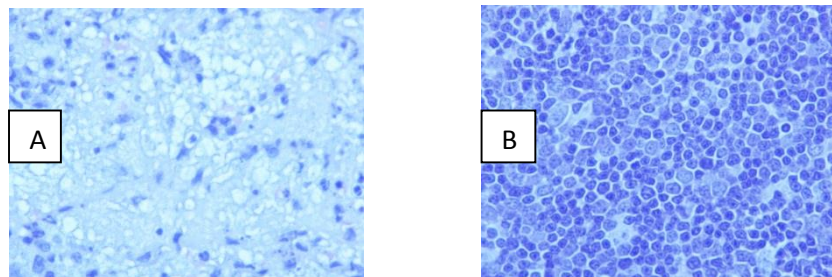
Passados 24 horas após a injeção de LPS ou AD, o timo e o baço foram removidos, dissecados e postos para a rotina histológica, de acordo com a técnica descrita para a fixação, a inclusão, microtomia e coloração (RIEDER; SCHMIDT, 1987).

Os tecidos foram fixados em formaldeído na solução tampão fosfato, e incluídos em parafina e posteriormente cortados em micrótomo (micrótomo Leica RM 2125RT, Houston, EUA) em peças de 5mm. Posteriormente fixados em lâminas histológicas com albumina. As lâminas foram lavadas e coloridas em concentrações

crescentes de etanol e soluções xylene, seguidas de coloração com hematoxilina-eosina. Os cortes histológicos foram analisados no microscópio Nikon, Eclipse 80i.

O timo foi fotografado com um aumento de 400x, diferenciando a medula (Fig 1A) e o córtex (Fig 1B) para posterior análise da celularidade. Foram realizadas 30 fotografias em cada zona do timo, por lâmina. Para a contagem, foi utilizado um macro no programa ImageJ 1.37v® (National Institutes of Health, Bethesda, EUA).

Figura 1: Fotografia do timo para contagem de células. A figura 1A mostra a medula e a 1B mostra o córtex tímico.



Para a análise da morfometria, o timo foi fotografado com um aumento de 40x (Figura 2). Foram feitas de 8 a 10 fotos por lâmina. Realizou-se a diferenciação entre zona medular (M), cortical (S) e tecido não linfóide (N). Para esta análise, foi utilizado o programa ImageJ.

Na análise morfométrica do baço (figura 3), o tecido foi fotografado com um aumento de 40x. Foram feitas 8 a 10 fotos. Realizou-se a diferenciação entre folículos Esplênicos (F), e delimitação externa da zona marginal (Z). Para esta análise, foi utilizado o programa ImageJ. Também foi realizada a contagem total de folículos esplênicos.

Figura 2 - Fotografia do timo para análise morfométrica. A imagem mostra a zona medular (M), a zona do córtex (O) e o tecido não linfóide (N). Foi utilizado para análise o programa ImageJ.

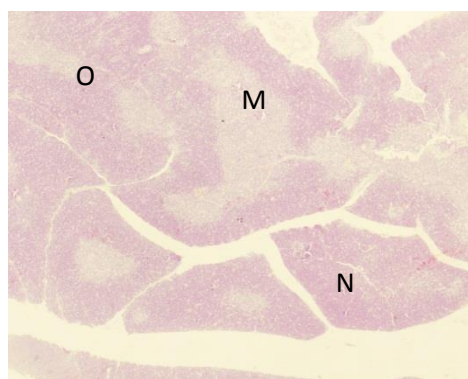
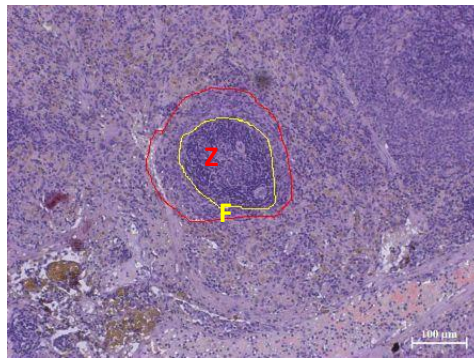
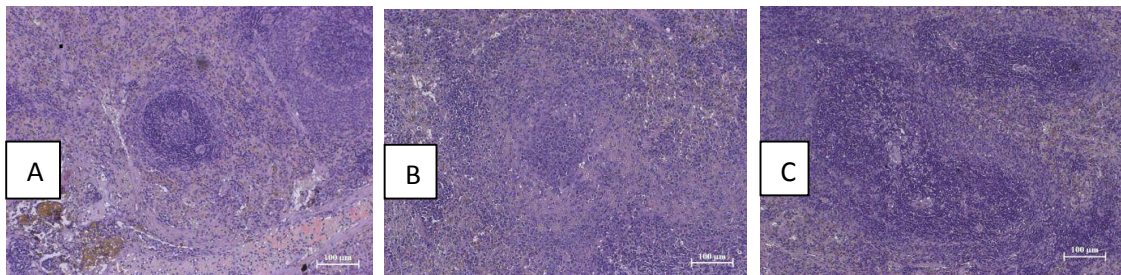


Figura 3: Fotografia do baço para análise morfométrica. Na imagem é possível observar o folículo esplênico (F) e a zona marginal(Z). Foi utilizado para análise o programa ImageJ



O baço também foi classificado em grau de organização estrutural da polpa branca. O tecido foi analisado tal como descrito por estudos prévios(SANTANA *et al.*, 2008). A análise foi realizada por dois investigadores treinados. Resumidamente, a organização polpa branca do baço foi classificada como 1- bem organizado - com bainha peri-arteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e da zona marginal bem distintos(Figura 4A), 2 - moderadamente desorganizado - quando a polpa branca era evidente, mas a sua regiões foram mal individualizada ou indistintos(Figura 4B) e 3- altamente desorganizada - quando a estrutura folicular foi mal distinta da polpa vermelha e áreas de células T (Figura 4C).

Figura 4: Fotografia do baço mostrando diferentes níveis de organização da poupa branca. (A) Bem organizada (B) moderadamente organizada e (C) Poupa branca altamente desorganizada.



4.4 Análise estatística

Os resultados são apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM). Para a análise estatística, os dados foram analisados por meio do teste ANOVA two-way, foi utilizado o teste post hoc de Bonferroni. A significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Percentagens também foram utilizadas para expressar os resultados. O programa estatístico utilizado foi o GraphPad Prisma 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, EUA).

5. ARTIGO

Title: Effects of moderate physical training on the morphology of the thymus and spleen of adult rats submitted to a perinatal protein restriction

Short-title: Physical training, morphology of lymphoid tissues and protein restriction

Authors:

Diógenis Barbosa de Moura¹, Sueli Moreno Senna², Daíllo Augusto Pereira Lopes¹, Yves Tourneur¹, Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Jr², José Candido Ferraz Jr.¹, Carol Góis Leandro¹

¹Department of Physical Education and Sport Science ã Academic Center of Vitoria de Santo Antão ã Federal University of Pernambuco, Brazil.

²Department of Nursing ã Academic Center of Vitoria de Santo Antão - Federal University of Pernambuco, Brazil.

Address of corresponding author:

Carol Gois Leandro

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte ã CAV/UFPE

Rua Alto do Reservatório, s/n ã CEP: 55608-680 - Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE ã Brasil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351

E-mail: carolleandro22@gmail.com

Abstract

Background/Aims. Maternal protein restriction is a well-known inducer of short and long-term physiological adaptations. These adaptations are not deterministic and can be modulated by physical training (T). The effects of a moderate physical training on the low-protein-induced changes on morphometry of thymus and spleen of endotoxemic rats were evaluated.

Methods. Male Wistar rats were divided into two groups according to their mother's diet during gestation and lactation, control (C, 17% casein) and, undernourished (Low-protein diet, LP, 8% casein). At the 63th day post-natal, animals were submitted to moderate physical training (8 wk, 5 d.wk⁻¹, 60 min.d⁻¹, at 70% of VO_{2max}) or not. After physical training period, half of each group received an injection of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. The morphology of the thymus and spleen was analyzed. The level of organization of the white splenic pulp was described as percentage.

Results. LP pups showed a reduced total cell count in both thymus cortex and medulla cellularity when compared to C pups. The morphology of the thymus was similar among groups, even under the effects of LPS. LP pups showed a reduction of the zone marginal area when compared to C group. In the splenic follicles area, all groups presented an increase when compared to control. These changes were not seen in the LP + T group. LP group showed a high percentage of disorganized slides from splenic white-pulp. Those alterations were attenuated in trained animals.

Conclusions. Physical training attenuates the effect of nutritional programming on the morphometry of the thymus and spleen in adult rats. Our findings supports the hypothesis that positive environmental stimulus, such as moderate physical training, can modulate a programmed organism by perinatal undernutrition.

Key-words: Phenotypic plasticity, physical exercise, lymphoid tissue, protein restriction, rats

5.1 Introduction

Low-protein restriction during perinatal life is recognized to have long-term effects upon tissue morphology and function of the immune system (CROMI *et al.*, 2009; STARR *et al.*, 2014). Previous studies have reported that neonatal malnutrition (multideficient diet with 7% of protein) induced decrease *in vitro* nitric oxide release by alveolar macrophage of adult rats when compared to their control whose mothers fed a normal diet (23% of protein) (FERREIRA *et al.*, 2009). In litters with 16 pups, there was a reduction in absolute and relative numbers of splenic lymphocyte subpopulations (CORTES-BARBERENA *et al.*, 2008). Recently, it was demonstrated that perinatal low-protein diet (8% casein) is related to neutrophilia and lymphopenia, reduction in the number and size of the splenic follicles (47.4%) and a lower area of marginal zone in response to lipopolysaccharide (LPS). Furthermore, perinatal low-protein diet is associated to deficits in cell-mediated immunity, suppression of antibody response to vaccination and involution of lymphoid tissues such as the thymus and spleen (MCDADE *et al.*, 2001).

The thymus is histologically most consistent of the lymphoid tissues, where the epithelial cells form an open framework containing predominantly T lymphocytes, smaller populations of B lymphocytes and plasma cells and scattered populations of other cells such as neuroendocrine cells (PEARSE, 2006). It is divided into a morphologically distinct cortex and medulla separated by a vascular corticomedullary zone (PEARSE, 2006). The rodent thymus develops from developing hematopoietic tissues (gestational day 11–12 in the mouse), and then, thymus becomes a lymphoepithelial organ (PEARSE, 2006). The spleen is a secondary lymphoid organ consisting of three main compartments: the red pulp, where red blood cells are captured and recycled; the marginal zone containing marginal zone B cells and phagocytes positioned along the marginal sinus, and the white pulp composed of nodules containing lymphoid follicles (rich in B-lymphocytes) (MEBIUS e KRAAL, 2005). In humans, intrauterine growth restriction (IUGR) is associated with a disproportionately small thymus and the thymic involution may be part of the fetal neuroendocrine response to intrauterine starvation (CROMI *et al.*, 2009). Previous studies have shown that both thymus and spleen are vulnerable to the effects of maternal undernutrition (FERNANDEZ *et al.*, 1985; MARIN *et al.*, 1995; CROMI *et al.*, 2009). However, less is known about the morphology of these tissues in adult rats

that were submitted to perinatal malnutrition. Given the central role of the thymus and spleen in immune development, understanding whether and how they can be affected by maternal malnutrition in early fetal and postnatal life, and the long-term impact of this, is important.

Physical exercise is a well-known inductor of positive organic adaptations, especially for the immune system (LEANDRO, C. G. *et al.*, 2007). Experimental studies in animals suggest that moderate physical training, especially when performed before tumorigenesis, can retard, delay, or prevent the incidence, progression, or spread of experimental tumors (BACUAU *et al.*, 2000). Our previous studies have verified that moderate physical training exercise (75% VO₂max, 5 times week, during 8 weeks) attenuated the long-last effects of a perinatal low-protein diet on the blood lymphocyte subsets and the morphology of the spleen (MOITA, L. *et al.*, 2011). More recently, we demonstrated that moderate physical training attenuated the effects of a perinatal protein restriction on the population of splenic lymphocytes by reducing apoptosis in trained offspring, despite exposure to adverse perinatal nutritional and immunologic challenges throughout life (SENNA, S. M. *et al.*, 2015).

In order to test the hypothesis that physical training attenuates the effects of a perinatal low-protein diet on the histology of the thymus and spleen, the aim of the present study was to verify the effects of a moderate physical training on the morphometry of the spleen of endotoxemic rats submitted to a low protein diet during gestation and lactation. The endotoxic model used in the present study was the administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS) (ROELFSEMA *et al.*, 2001).

5.2 Material and Methods

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences Center (protocol no. 23076.021093/2011-99), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

5.2.1 Animals and Diet

Male pups Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. On postnatal day 1 (P1), litters were reduced to 8 pups per mother, ensuring only males per litter when possible. During

the suckling period, male pups were randomly distributed into two nutritional groups according to their mother's diet during gestation and lactation: a well-nourished group (C, n=32) and a low-protein group (LP, n=32). At weaning (P25), male offspring (2 ñ 3 from each mother) remained in the experiment and received standard chow for rodents Labina® (Purina Brazil) until the end of the experiment, when they were killed by decapitation. Female pups were used in another experiment. At the P63, animals were divided into four groups according to physical training: control (C, n=16), low-protein diet (LP, n=16), control and submitted to training (T, n=16), and low-protein diet and submitted to training (LP+T, n=16). Trained rats run in a treadmill over a period of 8 weeks (5 days.wk-1, 60 min.day-1, at 70% VO_{2max}) (LEANDRO, CAROL GÓIS *et al.*, 2007). After 24 h of the last exercise session, half of the number of rats in each group received an injection of either lipopolysaccharide (LPS) (1mg/mL/kg *i.p.*; *E. coli* serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) or distilled water (1ml/kg, *i.p.*). Four more groups were then formed: control (C, n = 8), control toxemic (C + LPS, n = 8), low-protein (LP, n = 8), low-protein toxemic (LP + LPS, n = 8), trained (T, n = 8), trained toxemic (T + LPS, n = 8), low-protein and trained (LP + T, n = 8), and low-protein and trained and toxemic (LP + T + LPS, n = 8). After 24h of the injection of LPS, rats were decapitated and the thymus and spleen were collected.

5.2.2 Protocol of Moderate Physical Training Protocol

The protocol of physical training was performed according to previous study (LEANDRO, CAROL GÓIS *et al.*, 2007). Briefly, rats ran in a treadmill (EP-131®, Insight Equipments, SP, Brazil) during 8 weeks (5 days.wk-1, 60 min.day-1). The protocol was divided into four progressive stages in each session: (i) warm-up (5 minutes); (ii) intermediary (20 minutes); (iii) training (30 minutes), and (iv) cool-down (5 minutes) periods. The percentage of VO_{2max} during the sessions of training was kept around 65 ñ 70%; the exercise was classified as aerobic with moderate intensity of effort (LEANDRO, C. G. *et al.*, 2007). The non-trained group remained in their cages. The animals were not submitted to any kind of reinforcement during exercise.

5.2.3 *Thymus and spleen histologic preparation*

The tissues were removed, dissected, and carefully cut in longitudinal pieces. After dissection, tissues were cut (Microtome Leica, RM 2125RT, Houston, TX, USA) in coronal sections (5 mm thick), placed on slides coated with 3-triethoxysilylpropylamine (Sigma, St. Louis, MO, USA), and fixed with 1% formaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 37°C overnight. Slides were washed in a graded series of xylene and ethanol. The slides were stained with hematoxylin-eosin for 15 s, dehydrated with increasing concentrations of ethanol and xylene, and mounted. Tissues areas and staining intensities of individual histologic areas were analyzed with an Olympus BX41 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan; 400x). Histologic slides were analyzed using computerized image analysis ImageJ 1.37v® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). At least six cuts were analyzed from each animal per group.

5.2.4 *Size of the marginal zone and the lymphoid follicles*

For morphometric analysis, the spleens were analyzed (8–12 microscope fields of each type; magnification 40x, 10x in a continuous fashion). Only appropriate areas fulfilling the morphologic criteria were analyzed and no other selection was done. The area of the whole section was first determined by projection of the slide on to the screen of an optic microscope (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan; 100x) equipped with micro-camera Motic®. After having drawn the borders of each section, the area of the section and the white pulp area were expressed in pixels units. The area of the marginal zone was evaluated by subtracting the projected external and internal limit (mantle zone of the follicle). The area of marginal zone and lymphoid follicle were analyzed using computerized image analysis ImageJ 1.37v® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). At least six slices were analyzed from each animal per group.

The spleen was also classified in terms of degree of white pulp structural organization. The tissue was analyzed as described by previous study (SANTANA *et al.*, 2008). Briefly, the splenic white pulp organization was classified as: 1- well organized ñ with distinct peri-arteriolar lymphocyte sheath, germinal center, mantle zone and marginal zone; 2 - moderately disorganized ñ when the white pulp was

evident, but its regions were poorly individualized or indistinct; 3- highly disorganized ñ when the follicular structure was barely distinct from the red pulp and T-cell areas (Fig 3C).

5.3 Statistical Analysis

Data are presented as means $\pm$ standard error of the mean (SEM). For statistical analysis, data were analyzed by two-way repeated- measures ANOVA, with maternal diet (C, LP) and physical training (T, T + LP) as factors. Bonferroni's post hoc test was used. Significance was set at $p < 0.05$. Percentages were also used for express the results. The statistical program used was GraphPadPrisma 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

5.4 Results

LP pups showed a reduced total cell count in both thymus cortex and medulla cellularity when compared to C pups (Fig 1). In the LP + T group, the count of cells was recovered in both tissue (Figure 4A and 4B).

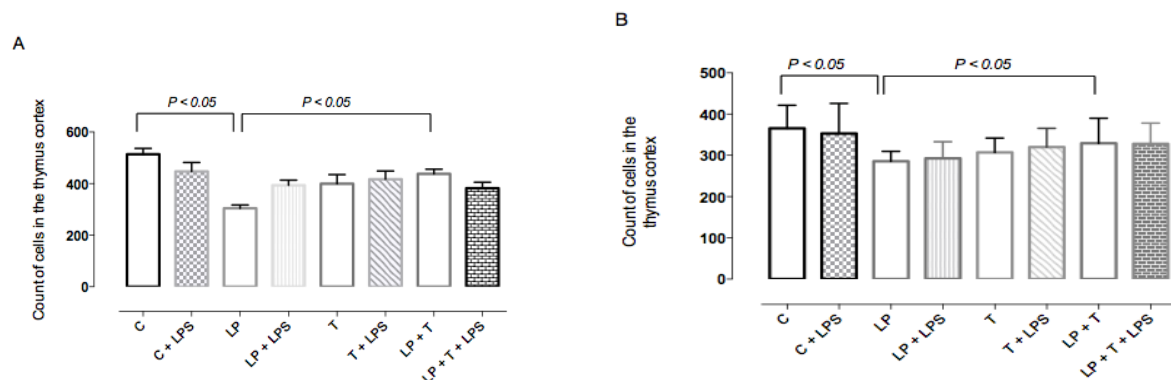


Figure 1. Count of cells in the thymus cortex [A] and medulla [B]: control (C), control toxemic (C+LPS), undernourished (LP), undernourished toxemic (LP+LPS), control and submitted to physical training (T), control and submitted to physical training and toxemic (T+LPS), undernourished and submitted to physical training (LP+T), and undernourished and submitted to physical training and toxemic (LP+T+LPS). The analyses were performed twenty-four hours after the injection of either LPS or saline ($n = 8$ for each group). Data are presented as means $\pm$ S.E.M. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test for statistical analysis.

The morphology of the thymus was similar among groups, even under the effects of LPS. On the other hand, in the spleen morphometric analysis, LP pups showed a reduction of the zone marginal area when compared to C group. The LP +

T group showed an increase when compared to the LP group (Figure 2A). In response to LPS, stimulation, only C and LP showed an increase when compared to their baseline values (Figure 2A). In the splenic follicles area, all groups presented an increase when compared to control (Figure 2B). In response to LPS, only the control group showed an increase of the splenic follicle area (Figure 2B).

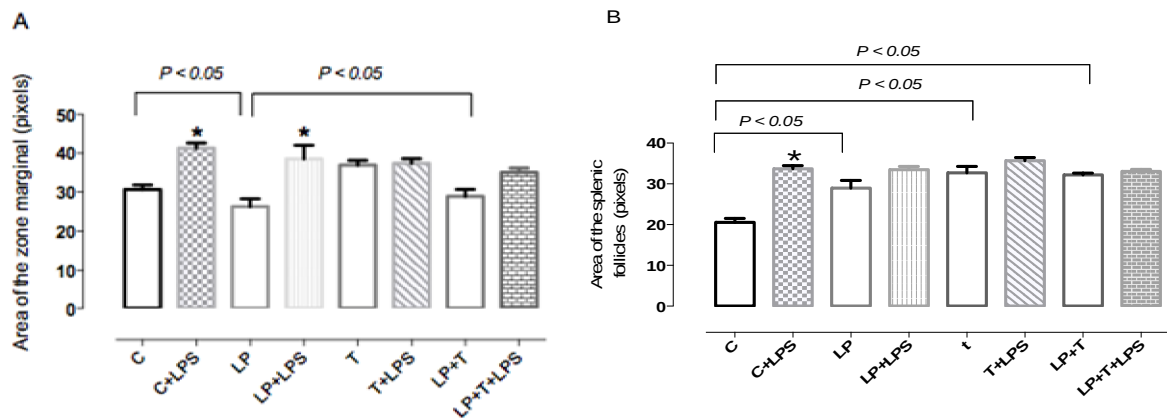


Figure 2. Area of the splenic marginal zone [A] and follicular [B]: control (C), control toxemic (C+LPS), undernourished (LP), undernourished toxemic (LP+LPS), control and submitted to physical training (T), control and submitted to physical training and toxemic (T+LPS), undernourished and submitted to physical training (LP+T), and undernourished and submitted to physical training and toxemic (LP+T+LPS). The analyses were performed twenty-four hours after the injection of either LPS or saline (n = 8 for each group). Data are presented as means $\pm$ S.E.M. * P < 0.05 LPS vs the respective baseline values. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test for statistical analysis.

At baseline values, all groups showed a good percentage of well-organized slides (type I) of the spleen, except the LP group (table 1). After LPS stimulation, there was an increase in the percentage classified as Type II. LP and LP + LPS showed a high percentage of slides moderately disorganized and highly disorganized (table1).

Table1: Percentage of white splenic organization. Control (C), control toxemic (C+LPS), undernourished (LP), undernourished toxemic (LP+LPS), control and submitted to physical training (T), control and submitted to physical training and toxemic (T+LPS), undernourished and submitted to physical training (LP+T), and undernourished and submitted to physical training and toxemic (LP+T+LPS). The analyses were performed twenty-four hours after the injection of either LPS or saline (n = 8 for each group).

Groups	Level of organization		
	Type 1 (%)	Type 2 (%)	Type 3 (%)
C	62.5	00	37.5
C + LPS	6.6	73.3	13.3
LP	00	43.75	56.25
LP + LPS	00	37.5	62.5
T	25	56.25	20
T + LPS	31.25	43.75	25
LP + T	12.5	62.5	25
LP + T + LPS	26.6	53.3	13.3

5.5 Discussion

The human thymus is a primary lymphoid organ where bone marrow-derived precursors undergo differentiation and selection, ultimately leading to the migration of positively selected thymocytes to the periphery (SAVINO *et al.*, 2002). In the present study, there was an expected reduction in the total cell count in both thymus cortex and medulla cellularity. Data from both animal studies and observational research in humans suggest poor thymus development may lie on the causal pathway between maternal nutrition and the high susceptibility to infection later in life (SAVINO, W., 2002; MOORE *et al.*, 2009; MOORE *et al.*, 2014). Studies using rodent models show maternal protein restriction during pregnancy and lactation, followed by catch-up growth, is associated with shortened cell-immunity capacity and high risk of mortality and morbidity (FERNANDEZ *et al.*, 1985; PEARSE, 2006; STARR *et al.*, 2014). It is proposed that these effects are mediated through differential thymus growth. Previous human study have observed that a small thymus at birth and at 6 months of age is a strong and independent risk factor for infection-related mortality up to 24 and 36 months of age (GARLY *et al.*, 2008). Given the central role of the thymus in the establishment of T-cell mediated immunity, the early life development of the thymic micro-environment is therefore critical for the establishment of a normal peripheral T-lymphocyte immune system.

In the present study, it was demonstrated that moderate physical training was able to restore the cellularity of thymus cortex and medulla. Previous study verified

that regular physical exercise (70% $\text{VO}_{2\text{max}}$, 1 hour/day, 5 days/week, 8 weeks) recovered the count of circulating lymphocytes and reduced the rate of splenic lymphocytes apoptosis in endotoxemic LP offspring rats submitted to a maternal low-protein diet (SENNA, S. M. *et al.*, 2015). The present study confirmed the hypothesis that moderate physical training attenuates the maternal low-protein diet-induced thymus cellularity changes by a mechanism that may include adaptation to repeated bouts of light-to-moderate exercise associated to adaptive endocrine response to the proliferative activity of lymphocytes from thymus (SHIMIZU *et al.*, 2008). In fact, moderate physical exercise increased the percentage of TCD4 lymphocytes in blood and thymus and attenuated the rate of lymphocytes apoptosis in the thymus of adult rats submitted to acute restraint stress (LEANDRO *et al.*, 2006). The mechanism was associated to the adaptive response of corticosterone concentration to moderate physical training (LEANDRO *et al.*, 2006). Our previous study showed that LP + T offspring normalized the corticosterone concentration after LPS injection (MOITA, L. *et al.*, 2011). Thus, it is possible to consider that physical training can be an important environmental stimulus that induces positive adaptations on immune and endocrine systems even though the system was programmed to develop growth restriction of tissues.

Aligned with previous studies (MOITA, L. *et al.*, 2011), we verified that maternal low-protein diet was also able to induce a reduction of the zone marginal and an increase the follicular area. Only C and LP groups were responsive to the LPS stimulation. Maternal nutritional deficits have been demonstrated to induce high rate of apoptosis in endotoxemic rats (LANGLEY-EVANS e CARRINGTON, 2006; ORTIZ *et al.*, 2009; SENNA, S. M. *et al.*, 2015). On the other hand, maternal malnutrition can be associated to a longer period of permanence of B-cells in the follicular compartment by a mechanism that includes down-regulation of the migration of B-cells from the marginal zone to follicular zone (MEBIUS e KRAAL, 2005). The concentration of plasma corticosterone can be suggested as a hormonal mechanism once these animals are the most susceptible to glucocorticoids-induced apoptosis (MOITA, L. *et al.*, 2011). It was interesting to note that there was no response to LPS stimulation in T and LP + T groups. This finding is aligned with previous studies (MOITA, L. *et al.*, 2011; SENNA, S. M. *et al.*, 2015). Moderate physical training is a well-known inducer of neuro-endocrine adaptations, such as reduced adrenal

sensitivity to ACTH and an increased ACTH/cortisol ratio during post-exercise recovery (DUCLOS *et al.*, 2003). This can be an adaptive mechanism that protects the glucocorticoids-sensitive tissues against one increased secretion of these hormones.

The level of organization of the white-pulp splenic area was different among groups. LP pups showed a high percentage of disorganization regardless the LPS stimulation. Malnutrition in early life can affect the embryogenesis of lymphoid organs and result in an expansion of leukocytes causing changes of the splenic microanatomy (LANGLEY-EVANS e CARRINGTON, 2006). This finding, together with the morphological analysis of distinct areas of the lymphoid tissue, indicates that structural disorganization is present in the white pulp of malnourished pups. We also observed that disorganization of the splenic lymphoid tissue was more frequent in animals submitted to toxemic stimulation. A variety of changes, including the loss of cell populations and the impairment of cell migration to the different splenic compartments may explain this level of disorganization (MOITA, L. *et al.*, 2011). However, the loss of the architectural structure was attenuated in pups submitted to a moderate physical training. At least 75% of the white-splenic area in LP + T group was into Type 1 and 2 level of organization. The physiological response to exercise is a system-wide action coordinated by the integration between the immune and the neuroendocrine systems. In addition, physical exercise is the only physiological stress where the neuroendocrine and immune systems contribute to accommodating the increase in physiological demands (FRAGALA *et al.*, 2011). Such adaptations reduce the magnitude of actual environmental demand or minimize the long-last effect of a programming challenge (induced by maternal undernutrition) to within homeostatic limits (LEANDRO, C. G. *et al.*, 2012; SENNA, S. M. *et al.*, 2015).

In conclusion, we demonstrated the maternal protein restriction changed the morphology of thymus and spleen by reducing the architecture of these organs. Because of the plasticity of the immune system to environmental demand, these change can be considered reversible once physical training attenuates the effect of nutritional programming on the morphometry of the thymus and spleen in adult rats. The mechanism, at least in part, can be related to the endocrine adaptation to repeated bouts of exercise. Aligned with previous studies, our findings supports the

hypothesis that positive environmental stimulus, such as moderate physical training, can modulate a programmed organism by perinatal undernutrition.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Level -or Education- Personnel (CAPES) and State of Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE).

5.6 References

BACUAU, R. F. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell Biochem Funct**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 249-58, Dec 2000.

CORTES-BARBERENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clin Exp Immunol**, México, v. 152, n. 3, p. 585-92, Jun 2008.

CROMI, A. et al. Ultrasonographic measurement of thymus size in IUGR fetuses: a marker of the fetal immunoendocrine response to malnutrition. **Ultrasound Obstet Gynecol**, Varese, v. 33, n. 4, p. 421-6, Apr 2009.

DUCLOS, M.; GOUARNE, C.; BONNEMAISON, D. Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids. **J Appl Physiol**, Bordeaux, v. 94, n. 3, p. 869-75, Mar 2003.

FERNANDEZ, S.; MARIN, B.; MENENDEZ-PATTERSON, A. [Malnutrition in utero and lactation: relation between the weight gained by the mothers and the development of their offspring]. **Rev Esp Fisiol**, Buenos Aires, v. 41, n. 4, p. 387-93, Dec 1985. ISSN 0034-9402

FERREIRA, E. S. W. T. et al. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 16, n. 4, p. 219-27, 2009.

FRAGALA, M. S. et al. Neuroendocrine-immune interactions and responses to exercise. **Sports Med**, Storrs, v. 41, n. 8, p. 621-39, Aug 1 2011.

GARLY, M. L. et al. Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. **J Pediatr**, Copenhagen, v. 153, n. 5, p. 683-8, 688 e1-3, Nov 2008.

LANGLEY-EVANS, S. C.; CARRINGTON, L. J. Diet and the developing immune system. **Lupus**, Loughborough, v. 15, n. 11, p. 746-52, 2006.

LEANDRO, C. G. et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **Eur J Nutr**, Recife, v. 51, n. 7, p. 807-15, Oct 2012.

LEANDRO, C. G. et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, Recife, v. 21, n. 3, p. 751-6, Aug 2007.

LEANDRO, C. G. et al. APROGRAM OF MODERATE PHYSICAL TRAINING FOR WISTAR RATS BASED ON MAXIMAL OXYGEN CONSUMPTION. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, Recife, v. 21, n. 3, p. 751-756, 2007.

LEANDRO, C. G. et al. Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 13, n. 2, p. 105-13, 2006.

MARIN, M. C. et al. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **J Nutr**, Buenos Aires, v.125, n. 4, p. 1017-24, Apr 1995.

MCDADE, T. W. et al. Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. **Am J Clin Nutr**, Evanston, v. 74, n. 4, p. 543-8, Oct 2001.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, Amsterdam, v. 5, n. 8, p. 606-16, Aug 2005.

MOITA, L. et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 18, n. 2, p. 103-10, 2011.

MOORE, S. E. et al. Thymus development and infant and child mortality in rural Bangladesh. **Int J Epidemiol**, Dhaka, v. 43, n. 1, p. 216-23, Feb 2014.

MOORE, S. E. et al. Early-life nutritional and environmental determinants of thymic size in infants born in rural Bangladesh. **Acta Paediatr**, Dhaka, v. 98, n. 7, p. 1168-75, Jul 2009.

ORTIZ, R. et al. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. **Clin Exp Immunol**, Buenos Aires, v. 155, n. 1, p. 96-106, Jan 2009.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicol Pathol**, United Kingdom, v. 34, n. 5, p. 504-14, 2006.

ROELFSEMA, V. et al. The metabolic effects of endotoxin are differentially affected by the pattern of GH administration in the rat. **J Endocrinol**, Aukland, v. 171, n. 1, p. 173-81, Oct 2001.

SANTANA, C. D. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, Salvador, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **Eur J Clin Nutr**, Rio de Janeiro, v. 56 Suppl 3, p. S46-9, Aug 2002.

SAVINO, W. et al. The thymus gland: a target organ for growth hormone. **Scand J Immunol**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 5, p. 442-52, May 2002.

SENNA, S. M. et al. Moderate physical training attenuates perinatal low-protein-induced spleen lymphocyte apoptosis in endotoxemic adult offspring rats. **Eur J Nutr**, Recife, May 19 2015.

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

STARR, L. M. et al. Protein deficiency alters impact of intestinal nematode infection on intestinal, visceral and lymphoid organ histopathology in lactating mice. **Parasitology**, Quebec, v. 141, n. 6, p. 801-13, May 2014.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desnutrição proteica durante períodos críticos do desenvolvimento dos organismos, como gestação e lactação, induz a mudanças nos órgãos linfóides. Tais mudanças levar a alterações morfológicas durante a vida adulta dos organismos vivos, com consequente alteração na resposta imune desses indivíduos. Nossos achados revelam que o exercício físico de intensidade moderada é capaz exercer uma função moduladora dos efeitos deletérios tardios causados pela desnutrição perinatal.

O timo é um órgão linfóide primário, onde os precursores celulares vindo da medula óssea sofrem seleção e maturação, sendo responsável por suprir a demanda periférica de células T. O presente trabalho mostrou que a celularidade tímica foi reduzida no grupo LP, quando comparado ao grupo C. Alguns trabalhos sugerem que a desnutrição cause efeitos deletérios no timo, levando a diminuição da sua celularidade. Tais efeitos podem ser custosos para os organismos, causando incidência de infecções, sendo correlacionado, inclusive com a mortalidade infantil.

O baço é o órgão linfóide secundário responsável pela filtração do sangue e retenção de antígenos para a estimulação linfocitária. Neste trabalho, mostrou ser sensível a desnutrição proteica perinatal, apresentando uma redução da área da zona marginal, quando comparado ao grupo controle, também com aumento da área folicular no grupo LP. Outro efeito deletério da desnutrição durante períodos tidos como críticos, foi ao aumento da desorganização da poupa branca em filhotes desnutridos.

O exercício físico é o único estresse fisiológico em que os sistemas imunológico e neuroendócrino contribuem juntos para acomodar o aumento das exigências fisiológicas. O nosso estudo ajudou a firmar o EF moderado como modulador dos efeitos deletérios de insultos nutricionais durante o início da vida, sendo capaz de melhorar os efeitos da dieta LP no início da vida diante da celularidade do córtex e medula tímica, da área da zona marginal esplênica. Ajudando inclusive a melhorar indicadores da organização da poupa branca do baço.

Sendo assim, o Exercício físico moderado foi capaz de atenuar os efeitos da desnutrição proteica em períodos críticos do desenvolvimento, surgindo como um agente natural, de baixo custo, poucos riscos e com outros benefícios associados, com a capacidade de melhorar os efeitos da desnutrição perinatal. São necessários outros estudos com modelos humanos a fim de validar esses efeitos benéficos do EF. Se confirmados os benefícios, a sociedade poderá dispor de um forte artifício contra efeitos negativos causados pela má alimentação durante determinados períodos.

7. REFERÊNCIAS

ALTAMURA, M. et al. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, Darmstadt, Germany, v. 23, n. 2, p. 153-161, 2001.

BACUAU, R. F. et al. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. **Cell Biochem Funct**, Guildford, Surrey, v. 18, n. 4, p. 249-58, Dec 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11180287>. Acesso em: 01 fev. 2017.

BATISTA FILHO, M. et al. Anemia e obesidade: um paradoxo da transição nutricional brasileira. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 24, Sup. 2, p. S247-S257, 2008.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. Supl 1, p. 181-91, 2003.

CHEVALIER, P. et al. [Immuno-nutritional recovery of children with severe malnutrition]. **Sante (Montrouge, France)**, v. 6, n. 4, p. 201-208, 1995. ISSN 1157-5999.

CORTES-BARBERENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clin Exp Immunol**, [s.l.], v. 152, n. 3, p. 585-92, Jun 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18373698>. Acesso em: 01 fev. 2017.

CROMI, A. et al. Ultrasonographic measurement of thymus size in IUGR fetuses: a marker of the fetal immunoendocrine response to malnutrition. **Ultrasound Obstet Gynecol**, Bordeaux, v. 33, n. 4, p. 421-6, Apr 2009.

DUCLOS, M.; GOUARNE, C.; BONNEMAISON, D. Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids. **J Appl Physiol**, Bordeaux. 94, n. 3, p. 869-75, Mar 2003.

ENGELAND, C. et al. Psychological distress and salivary secretory immunity. **Brain, behavior, and immunity**, Pennsylvania, v. 52, p. 11-17, 2016.

FERNANDEZ, S.; MARIN, B.; MENENDEZ-PATTERSON, A. [Malnutrition in utero and lactation: relation between the weight gained by the mothers and the development of their offspring]. **Rev Esp Fisiol**, Oviedo v. 41, n. 4, p. 387-93, Dec 1985.

FERREIRA-E-SILVA, W. T. et al. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 16, n. 4, p. 219-227, 2009.

FERREIRA, E. S. W. T. et al. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 16, n. 4, p. 219-27, 2009.

FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate low physical training. **British Journal of Nutrition**, Recife, v. 109, n. 03, p. 449-456, 2013.

FRAGALA, M. S. et al. Neuroendocrine-immune interactions and responses to exercise. **Sports Med**, Storrs, v. 41, n. 8, p. 621-39, Aug 1 2011.

GARLY, M. L. et al. Thymus size at 6 months of age and subsequent child mortality. **J Pediatr**, Copenhagen, v. 153, n. 5, p. 683-8, 688 e1-3, Nov 2008.

HEATH, G. W. et al. Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. **Medicine and science in sports and exercise**, Atlanta, v. 23, n. 2, p. 152-157, 1991.

JONES, K. D.; BERKLEY, J. A.; WARNER, J. O. Perinatal nutrition and immunity to infection. **Pediatric Allergy and Immunology**, London, v. 21, n. 4p1, p. 564-576, 2010.

KESTEMAN, N. et al. Injection of lipopolysaccharide induces the migration of splenic neutrophils to the T cell area of the white pulp: role of CD14 and CXC chemokines. **Journal of leukocyte biology**, Gosselies, v. 83, n. 3, p. 640-647, 2008.

KUCHARSKI, R. et al. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science**, Canberra, v. 319, n. 5871, p. 1827-1830, 2008.

LANGLEY-EVANS, S. C.; CARRINGTON, L. J. Diet and the developing immune system. **Lupus**, v. 15, n. 11, p. 746-52, 2006.

LEANDRO, C. et al. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. **Revista portuguesa de ciências do desporto**, Recife, v. 2, n. 5, p. 80-90, 2002.

LEANDRO, C. G. et al. Can maternal physical activity modulate the nutrition-induced fetal programming? **Revista de Nutrição**, Recife, v. 22, n. 4, p. 559-569, 2009.

LEANDRO, C. G. et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. **European journal of nutrition**, Recife, v. 51, n. 7, p. 807-815, 2012.

LEANDRO, C. G. et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, Recife, v. 21, n. 3, p. 751-6, Aug 2007.

LEANDRO, C. G. et al. Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 13, n. 2, p. 105-13, 2006.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **The childhood environment and adult disease**, Cambridge, v. 1991, p. 38-55, 1991.

MARIA SUSANA, F.; PAULA, P.; SLOBODIANIK, N. Dietary Modulation of Thymic Enzymes. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, Buenos Aires, v. 14, n. 4, p. 309-312, 2014.

MARIN, M. C. et al. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. **J Nutr**, Buenos Aires, v. 125, n. 4, p. 1017-24, Apr 1995.

MATTHEWS, C. E. et al. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. **Medicine and science in sports and exercise**, Columbia, v. 34, n. 8, p. 1242-1248, 2002.

MCDADE, T. W. et al. Prenatal undernutrition, postnatal environments, and antibody response to vaccination in adolescence. **Am J Clin Nutr**, Evanston, v. 74, n. 4, p. 543-8, Oct 2001.

MEBIUS, R. E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. **Nat Rev Immunol**, Amsterdam, v. 5, n. 8, p. 606-16, Aug 2005.

MELLO, A. S. et al. Protein malnutrition alters spleen cell proliferation and IL-2 and IL-10 production by affecting the STAT-1 and STAT-3 balance. **Inflammation**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 2125-2138, 2014.

MOITA, L. et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. **Neuroimmunomodulation**, Recife, v. 18, n. 2, p. 103-110, 2011.

MOORE, S. E. et al. Thymus development and infant and child mortality in rural Bangladesh. **Int J Epidemiol**, Dhaka, v. 43, n. 1, p. 216-23, Feb 2014.

MOORE, S. E. et al. Early-life nutritional and environmental determinants of thymic size in infants born in rural Bangladesh. **Acta Paediatr**, Dhaka, v. 98, n. 7, p. 1168-75, Jul 2009.

NASSAR, M. et al. T-lymphocyte subsets and thymic size in malnourished infants in Egypt: a hospital-based study. **Eastern Mediterranean Health Journal**, Cairo, v. 13, n. 5, p. 1031-1042, 2007. ISSN 1020-3397.

NIEMAN, D. et al. The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. **International journal of sports medicine**, Loma Lindav. 11, n. 6, p. 467-473, 1990.

NIEMAN, D. C. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. **Medicine and science in sports and exercise**, Loma Linda, v. 26, n. 2, p. 128-139, 1994.

ORTIZ, R. et al. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. **Clin Exp Immunol**, México, v. 155, n. 1, p. 96-106, Jan 2009.

PEARSE, G. Normal structure, function and histology of the thymus. **Toxicol Pathol**, United Kingdom, v. 34, n. 5, p. 504-14, 2006.

POPKIN, B. M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. **Proceedings of the Nutrition Society**, Chapel Hill, v. 70, n. 01, p. 82-91, 2011.

PRENTICE, A. M. The thymus: a barometer of malnutrition. **British Journal of Nutrition**, London, v. 81, n. 05, p. 345-347, 1999.

REEVES, P.; NIELSEN, F.; FAHEY, G. Purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of nutrition purified Ad HOC writing committee on the reformulation of the AIN-79 A rodent diet. **Am institute Nutr J**, Urbana. v. 153, p. 1939-1951, 1993.

RIEDER, N.; SCHMIDT, K. Morphologische Arbeitsmethoden in der Biologie. **VCH**, Friedenweiler 1987.

ROELFSEMA, V. et al. The metabolic effects of endotoxin are differentially affected by the pattern of GH administration in the rat. **J Endocrinol**, Auckland. v. 171, n. 1, p. 173-81, Oct 2001.

ROSA, L.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Rev bras med esporte**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 167-72, 2002.

RYTTER, M. J. H. et al. The immune system in children with malnutrition: a systematic review. **Plos One**, Frederiksberg 2014.

SANTANA, C. D. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, Salvador, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **European journal of clinical nutrition**, Rio de Janeiro, v. 56, p. S46-9, 2002.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **Eur J Clin Nutr**, Rio de Janeiro, v. 56 Suppl 3, p. S46-9, Aug 2002.

SAVINO, W. et al. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, Rio de Janeiro, v. 98, n. S1, p. S11-S16, 2007.

SAVINO, W. et al. The thymus gland: a target organ for growth hormone. **Scand J Immunol**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 5, p. 442-52, May 2002.

SENNA, S. M.; FERRAZ JR, J. C.; LEANDRO, C. G. Perinatal malnutrition and the protective role of the physical training on the immune system. **Nutricion hospitalaria**, Recife, v. 32, n. 3, p. 967-976, 2015.

SENNA, S. M. et al. Moderate physical training attenuates perinatal low-protein-induced spleen lymphocyte apoptosis in endotoxemic adult offspring rats. **Eur J Nutr**, Recife, May 19 2015.

SENNA, S. M. et al. Moderate physical training attenuates perinatal low-protein-induced spleen lymphocyte apoptosis in endotoxemic adult offspring rats. **European journal of nutrition**, Recife, p. 1-10, 2015.

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

STARR, L. M. et al. Protein deficiency alters impact of intestinal nematode infection on intestinal, visceral and lymphoid organ histopathology in lactating mice. **Parasitology**, Ste-Anne-de-Bellevue, v. 141, n. 6, p. 801-13, May 2014.

WELLS, J. C. Obesity as malnutrition: the dimensions beyond energy balance. **European journal of clinical nutrition**, London, v. 67, n. 5, p. 507-512, 2013.

WEST-EBERHARD, M. J. **Developmental plasticity and evolution**. Oxford, 2003.

WEST-EBERHARD, M. J.. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Oxford, v. 102, n. suppl 1, p. 6543-6549, 2005.

8. ANEXO

Anexo A: Parecer do comitê de ética

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (51 81) 2126 8048 / 2126 8351
 Fax: (51 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 19 de agosto de 2011.

Ofício nº 388/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Profa. Carol Virginia Góis Leandro**
 Núcleo de Educação Física – Centro Acadêmico de Vitória
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 23076.021093/2011-99

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Desnutrição perinatal e sistema imunológico: papel modulador do treinamento físico moderado em ratos adultos endotoxêmicos”**.

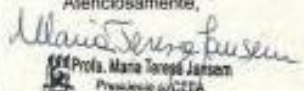
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos e Fêmeas; Idade: Serão utilizadas ratas adultas gestantes e seus filhotes que serão estudados na vida adulta; Peso: 220-250g (ratas) e 5-7g (filhotes); Número de animais previsto no protocolo: 10 ratas gestantes/lactantes e 48 filhotes machos.

Atenciosamente,



Profa. Maria Tereza Jansen
 Presidente da CEUA

CCB: Integrar para desenvolver