

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Patologia

Luanna Moita

Efeitos do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço  
de ratos adultos endotoxêmicos submetidos a desnutrição perinatal

Recife

2010

Luanna Moita

Efeitos do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço  
de ratos adultos endotoxêmicos submetidos a desnutrição perinatal

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Patologia do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal de Pernambuco para obtenção do  
título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de  
Pontes Filho

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carol Góis  
Leandro

RECIFE

2010

Moita, Luanna

Efeitos do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos a desnutrição perinatal / Luanna Moita. – Recife: O Autor, 2010.

79 folhas: il., tab., fig., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Patologia, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Baço. 2. Desnutrição. 3. Treinamento físico. I. Título.

611.41

CDU (2.ed.)

UFPE

611.41

CDD (20.ed.)

CCS2010-033



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE  
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo  
Fone/Fax: (81) 2126.8529  
<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



***DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
PATOLOGIA.***

**AUTORA: LUANNA MOITA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “EFEITOS DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO  
SOBRE A MORFOMETRIA DO BAÇO DE RATOS ADULTOS ENDOTOXÊMICOS  
SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PERINATAL”.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. NICODEMOS TELES DE PONTES FILHO**

**CO-ORIENTADORA: PROFA DRA. CAROL VIRGÍNIA GÓIS LEANDRO**

**DATA: 26 DE FEVEREIRO DE 2010.**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Tânia Cristina Python Curi

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

**VICE-REITOR**

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO**

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. José Thadeu Pinheiro

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

**COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA**

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**VICE - COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA**

Prof. Hilton Justino da Silva

RECIFE

2010

## DEDICATÓRIA

*A meu marido, pelo amor,  
carinho, confiança, fidelidade  
e apoio constante a minha  
formação profissional.  
Obrigada!*

## *Agradecimentos*

*A Deus, pela força concedida sempre que preciso.*

*A minha querida mãe **Regina**, pelo exemplo de luta.*

*A meu marido **Anderson Lopes**, grande companheiro, orientador da minha vida. Obrigada pelo amor, paciência e apoio.*

*Em especial a minha orientadora Prof<sup>a</sup>. **Carol Leandro** que me acolheu como orientanda. Obrigada pelas críticas pertinentes, pela confiança concedida, pela disposição incrível de trabalho, por ser forte perante aos obstáculos e por sua alegria.*

*A meu orientador Prof. **Nicodemos** por também me aceitar como orientanda, pelos ensinamentos importantes na execução deste trabalho e por me tratar sempre com bom humor.*

*A coordenação da Pós-Graduação em Patologia e as secretárias **Marilene e Tatiane** pelo apoio e amizade que desenvolvemos.*

*Aos professores do Mestrado em Patologia por seus ensinamentos.*

*Aos professores e amigos que despertaram minha curiosidade científica e que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico. Agradeço com carinho aos Professores **Mauro Cesar Passamani, Maria Ester Freitas e Paula Beatriz Krebsky** e as amigas **Eliziete Almeida e Luana Caroline**.*

*Aos meus colegas do mestrado: Alessandra, André, Carla, Carlos, Fernando, Horácio, Iraneide, Jaqueline, Juliana, João, Isabela, Marcela, Mariana, Tiago França e Thiago Assis.*

*A Carmelita Cavalcanti pela ajuda no preparo do material histológico.*

*Ao Dr. França e ao Sr. Paulino, pela competência e ensinamentos do manejo dos animais.*

*Aos meus queridos estagiários Marinaldo Lustosa e Amanda Tobias, que muito se esforçaram para a concretização deste trabalho. O que seria de mim sem vocês?*

*A Antônio, Iracema e Marco que me ajudarem em muitos momentos, e, principalmente pela amizade, dividindo momentos alegres, tristes, difíceis e importantes da minha vida.*

*Ao Prof. Raul pela atenção sempre concedida, pelos conselhos, sorrisos, estímulos, pelo exemplo de pesquisador.*

*Ao Prof. Roberto (Prof. Bob) pela atenção dispensada na análise do material, pelos ensinamentos e, sobretudo pela amizade e incentivo.*

*Aos novos amigos conquistados pelo grupo NNI: João, Taciana, Adriano, Filipi, Marcos André, Marcellus, América, Kelli, Raquel, Amanda Marcelino, Madge, Renata, Matilde e Aline.*

*A Lúcia Pires, Fernanda e as professoras Lígia Galindo, Sandra Lopes, Elizabeth do Nascimento, Wylla Tatiane, Fátima Galdino e Surama.*

*Às novas amízaes: Claudilene, Cícera, Camila, Isabel e Lucicleide.  
Pelos momentos difíceis e de descontração que passamos.*

*À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior  
(CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.*

*A finalização deste trabalho não seria possível sem a colaboração, o  
entendimento e o respeito de todos: colegas, amigos, professores e  
familiares.*

*Os mais sinceros agradecimentos àqueles que direta ou indiretamente  
contribuíram e auxiliaram na execução deste trabalho, permitindo  
que se tornasse realidade.*

*A todos, meu muito obrigada!*

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o efeito do treinamento físico moderado em alguns aspectos da morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição perinatal. **Métodos:** Ratos machos Wistar divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida às mães: controle (caseína a 17%, n=24) e desnutridos (caseína a 8%, n=24). Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos com relação ao treinamento físico moderado: controle (C, n=12), controle + treinamento físico (T, n=12), desnutrido (D, n=12) e desnutrido + treinamento físico (DT, n=12). O protocolo de treinamento foi realizado em esteira ergométrica durante 8 semanas (5 dias/sem, 60 min/dia a 70% do  $VO_{2max}$ ). Após 24h da última sessão de treinamento, metade dos animais de cada grupo recebeu injeção i.p. de lipopolissacarídeo, enquanto seus pares receberam injeção de solução salina. Foram registradas as mudanças dos indicadores somáticos, do percentual de leucócitos no sangue, do número e tamanho dos folículos linfóides e do tamanho da zona marginal esplênica. A contagem diferencial de leucócitos circulantes foi realizada através de esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido, a contagem e a morfometria dos folículos esplênicos e da zona marginal foram estudadas por microscopia óptica. **Resultados:** Na contagem diferencial de leucócitos do sangue não houve diferença com relação à desnutrição perinatal e ao treinamento físico moderado. Porém, quanto ao estímulo do lipopolissacarídeo houve neutrofilia e linfocitopenia. Na contagem de folículos linfóides, o grupo D apresentou menor número de folículos linfóides esplênicos quando comparados ao grupo C, porém isso não ocorre nos animais desnutridos treinados. Nos endotoxêmicos, o grupo D apresentou aumento da área dos folículos em menor proporção que o controle (C+LPS= 56,1% e D+LPS = 13,7%). Por outro lado, o grupo desnutrido treinado apresentou aumento da área folicular em maior proporção em relação ao seu controle (T+LPS= 6,9% e DT+LPS= 8,4%). O treinamento induziu um percentual de aumento inferior da área folicular e da área da zona marginal quando comparados aos não treinados (área folicular: C+LPS= 56,1%, T+LPS= 6,9%, D+LPS= 13,7% e DT+LPS= 8,4%; área da zona marginal: C+LPS= 29,12%, T+LPS= 11,76%, D+LPS= 47,48% e DT+LPS= 12,71%). **Conclusões:** O treinamento físico moderado exerce efeito protetor no baço em resposta ao estímulo com LPS, por reverter a seqüela da programação nutricional sobre o número de folículos linfóides nos animais desnutridos e, por atenuar a intensidade das respostas orgânicas agudas à situação de infecção, induzindo na resposta imune um mecanismo conhecido como tolerância cruzada.

**PALAVRAS-CHAVES:** Desnutrição, Sistema Imune, Baço, Treinamento físico.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect of moderate physical training in some aspects of the morphometry of the spleen in endotoxemic adult rats subjected to perinatal malnutrition. **Methods:** Male Wistar rats divided into 2 experimental groups according to the diet fed to mothers: control (casein 17%, n = 24) and malnourished (casein and 8%, n = 24). At 60 days of age, the groups were divided with respect to moderate physical training: control (C, n = 12), control + exercise training (T, n = 12), malnourished (D, n = 12) and malnourished + training Training (DT, n = 12). The training protocol was performed on a treadmill for 8 weeks (5 days / wk, 60 min / day at 70%  $VO_{2max}$ ). After 24 hours of the last session of exercise, half of each animals group received ip injection of lipopolysaccharide, while their peers were injected with saline. We recorded the changes of somatic indicators, the percentage of white blood cell count, the number and size of lymphoid follicles and the size of the splenic marginal zone. The differential count of leukocytes was performed using blood smears stained with Quick Panoptic kit, count and morphometry of splenic follicles and marginal zone were studied by light microscopy. **Results:** In the differential count of blood leukocytes was no difference with respect to perinatal malnutrition and moderate physical training. But as the stimulus of lipopolysaccharide was neutrophilia and lymphocytopenia. On the count of lymphoid follicles, the group D showed a lower number of splenic lymphoid follicles when compared to group C, but this does not occur in malnourished animals trained. In endotoxemic, group D showed an increase in area of hair to a lesser extent than the control (C + LPS = 56.1% and D + LPS = 13.7%). Moreover, the malnourished group trained showed an increase in follicle area in greater proportion in relation to its control (T + = 6.9% LPS and LPS + DT = 8.4%). Training induced a lower percentage of increase in the area of the follicular and marginal zone area when compared to untrained (follicular area: C + LPS = 56.1%, T + LPS = 6.9%, D = 13 + LPS, 7% and DT + LPS = 8.4%; marginal zone area: C + LPS = 29.12%, T + LPS = 11.76%, D + LPS = 47.48% and DT + LPS = 12, 71%). **Conclusions:** The moderate physical training exerts a protective effect in spleen in response to stimulation with LPS, by reversing the sequelae of nutritional programming of the number of lymphoid follicles in malnourished animals, and reduce the intensity of the organic to the situation of acute infection, inducing immune response in a mechanism known as cross-tolerance.

KEY WORDS: Malnutrition, Immune System, Spleen, Physical Training.

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Animais .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Manipulação da dieta durante a gestação e lactação.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Protocolo de Treinamento Físico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.4. Indicadores Somáticos .....</b>	<b>27</b>
<b>3.5. Administração de Lipopolissacarídeo (LPS) .....</b>	<b>28</b>
<b>3.6. Retirada dos Tecidos .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.1. Contagem diferencial de leucócitos do sangue .....</b>	<b>29</b>
<b>3.6.2. Baço .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6.2.1. Extração do Baço .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7. Análise Estatística .....</b>	<b>33</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>36</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>67</b>

## **APRESENTAÇÃO**

---

## 1. APRESENTAÇÃO

Uma alimentação saudável é de grande importância para que o indivíduo possa crescer e desenvolver-se de forma adequada. A desnutrição durante as fases iniciais da vida como na gestação e lactação pode ocasionar na fase adulta mudanças na estrutura e na função de órgãos e sistemas. Isso porque a desnutrição perinatal, a exemplo de qualquer outro agente agressor, prejudica os eventos relacionados ao desenvolvimento, sobretudo por alterar a disponibilidade do sangue da placenta ao feto, explicando assim as modificações fisiológicas.

No sistema imune, a desnutrição perinatal altera os mecanismos de defesa, como prejuízos da função fagocitária de macrófagos, do sistema complemento e da produção de citocinas como IL-2. Além disso, está associada à hipocelularidade em órgãos linfóides como timo e baço. O baço tem sido amplamente estudado por desempenhar papel proeminente durante as respostas imunes. Nele destaca-se a zona marginal, uma estrutura única não encontrada em outros órgãos linfóides e com papel importante tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa.

A zona marginal do baço pode ser definida como a separação da polpa vermelha com a polpa branca. Recebe filamentos terminais do sistema arterial que juntamente com o sangue admite e reconhece antígenos que chega ao baço, sendo sensível a produtos bacterianos a exemplo do lipolissacarídeo (LPS). A resposta leucocitária no baço, assim como nos demais órgãos linfóides, é determinada pelo estado nutricional, podendo ser comprometida pela desnutrição perinatal mesmo após a exposição à dieta equilibrada.

A resposta imune parece ser influenciada por fatores ambientais que induzem adaptações em sistemas fisiológicos, como por exemplo, a prática de exercício físico regular (treinamento físico). O treinamento físico, a depender de sua magnitude, mostra ser importante modulador da resposta imunológica. Particularmente o treinamento físico de intensidade moderada está associado a benefícios para a saúde, favorecendo muitas das funções imunes, como a dinâmica leucocitária. O efeito do treinamento físico no sistema imune é evidenciado quando este sistema é ativado, isso justifica nesta pesquisa o uso de lipopolissacarídeo.

Alguns estudos sobre os efeitos da desnutrição no início da vida e sobre o efeito imunoestimulador do treinamento físico moderado no sistema imunológico foram realizados. No entanto, não há estudos do nosso conhecimento que abordam o papel protetor do treinamento físico de intensidade moderada sobre os prejuízos nos mecanismos imunes

decorrentes da desnutrição no início da vida. Logo, mostra-se relevante realizar estudos sobre a temática. Além disso, o trabalho é de interesse, pois nossos resultados poderão fornecer subsídios para o estabelecimento de estratégias de intervenção que envolva nutrição e atividade física.

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito do treinamento físico moderado na morfometria dos folículos linfóides do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição perinatal. Os objetivos específicos deste trabalho consistem em avaliar o efeito do treinamento físico moderado em ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição perinatal sobre: a contagem diferencial de leucócitos do sangue, o número de folículos linfóides do baço, a morfometria da área dos folículos linfóides do baço e a morfometria da área ocupada pela zona marginal do baço. Assim, nossas hipóteses são que ratos adultos endotoxêmicos desnutridos no período perinatal apresentam redução do número de leucócitos diferenciais do sangue, do número de folículos linfóides esplênicos, da área desses folículos e da área ocupada pela zona marginal do baço, e que o treinamento físico moderado reverte os efeitos citados pela desnutrição perinatal em ratos adultos endotoxêmicos.

A contagem dos leucócitos do sangue foi realizada através da técnica de esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido e a análise do folículo linfóide e da zona marginal do baço por microscopia óptica. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) do Departamento de Nutrição; no Laboratório de Imagens do Departamento de Anatomia e no Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), todos da Universidade Federal de Pernambuco tendo como orientadores o Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carol Góis Leandro. Este trabalho originou o artigo científico intitulado: **“Efeito do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos a desnutrição perinatal”**, que será submetido para publicação como artigo original na revista “Experimental Physiology”. Este estudo avaliou o efeito do treinamento físico moderado sobre o número e tamanho do folículo linfóide e da zona marginal do baço de ratos adultos endotoxêmicos desnutridos no período perinatal.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Uma alimentação saudável é essencial nas etapas de crescimento e desenvolvimento das funções e estruturas do organismo (Gniuli, Calcagno *et al.*, 2008). As fases de gestação, lactação e primeira infância são caracterizadas por crescimento rápido, maturação de órgãos e sistemas, replicação e diferenciação celular, sendo chamadas de período crítico do desenvolvimento (Dobbing e Sands, 1985; I.O.M. (Institute of Medicine), 2002). Cada sistema fisiológico possui um período crítico que pode variar entre as espécies. Por exemplo, em ratos, a maturação do sistema nervoso ocorre no período de lactação (Smart, 1981; Carlson, Stead *et al.*, 2007; Hodyl, Walker *et al.*, 2007). Já o sistema imunológico apresenta o período crítico de desenvolvimento a partir das primeiras semanas de vida pré-natal, sendo a competência imunológica adquirida gradualmente após o nascimento tanto em humanos quanto em animais (Spencer, Martin *et al.*, 2006).

A falta ou deficiência de nutrientes, como as proteínas, durante o período crítico do desenvolvimento parece ter associações com a estrutura e função de tecidos na vida adulta (Lucas, 1991). Estudos epidemiológicos associaram o aparecimento de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis na fase adulta (obesidade, diabetes, cardiopatias e hipertensão) com o baixo peso ao nascer (Barker e Osmond, 1986; Barker, Osmond *et al.*, 1989; Hales e Barker, 1992; Law, 1996; Chukwuma e Tuomilehto, 1998). No sistema imunológico, a desnutrição durante a vida gestacional e neonatal induz prejuízos nos mecanismos imunes, como redução da função linfocitária, redução da migração de leucócitos para os locais de infecção e a diminuição da produção de citocinas como de IL-2 (Landgraf, Tostes Rde *et al.*, 2007; Cortes-Barberena, Gonzalez-Marquez *et al.*, 2008). Chandra (1997) aponta a desnutrição como uma das principais causas de deficiência secundária na resposta do organismo aos agentes infecciosos (Chandra, 1997). De forma semelhante, estudos experimentais com roedores gravemente desnutridos (4% de proteínas) mostram redução de parâmetros da imunidade inespecífica e específica, por exemplo, menor ativação de macrófago, leucopenia com diminuição de granulócitos polimorfonucleares, linfócitos e monócitos (Fock, Vinolo *et al.*, 2007).

O sistema imune é responsável pelo combate a microorganismos invasores, remoção de células mortas e resíduos celulares e estabelecimento da memória imunológica (Schulenburg, Kurz *et al.*, 2004). Os leucócitos são as células que compõem o sistema imune e podem ser classificados em granulócitos polimorfonucleares, monócitos / macrófagos e

linfócitos (Schulenburg, Kurz *et al.*, 2004). As células do sistema imune são originadas a partir de um progenitor hematopoiético pluripotente, localizado na medula óssea e no timo, e as diferenciações posteriores decorrentes da estimulação e ativação pelo antígeno ocorrem também na medula óssea e em outros órgãos como linfonodo e baço (Schulenburg, Kurz *et al.*, 2004).

O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo (Altamura, Caradonna *et al.*, 2001). É altamente vascularizado, com função de promover filtração do sangue e retenção de antígenos para estimulação linfocitária. Possui uma rede de folículos linfóides por onde circulam várias células do sistema imunológico: linfócitos B, TCD4+ e TCD8+, plasmócitos e outras células linfóides maduras, aptas a realizar uma resposta imunitária (Torres, 2000; Altamura, Caradonna *et al.*, 2001). No feto humano, o baço atua como um centro hematopoiético até o final da gestação, e como produtor de linfócitos e monócitos ao longo da vida (Hata, Kuno *et al.*, 2007). Seu desenvolvimento começa durante a quinta semana de gestação, crescendo como um agregado de células retículo-mesenquimais no mesentério dorsal do estômago (sexta e sétima semana de gestação) (Hata, Kuno *et al.*, 2007). Nesta época, adquire suas características morfológicas com a presença de lóbulos, que tendem a desaparecer antes do nascimento (Hata, Kuno *et al.*, 2007).

O baço é formado por dois compartimentos morfológica e funcionalmente diferentes: a polpa vermelha e a polpa branca, porém com funções centradas no sistema circulatório. É na polpa vermelha o principal sítio esplênico de filtração sanguínea e remoção de antígenos e de hemáceas envelhecidas, também é encarregado de armazenar ferro e plaquetas. Já a polpa branca desempenha papel importante de iniciar resposta imune a antígenos como, por exemplo, produtos bacterianos provenientes da circulação (Cesta, 2006).

Topograficamente a polpa branca é dividida em zona marginal, folículos linfóides e bainha de linfócitos T periarteriolar (Groeneveld e Van Rooijen, 1984; Cesta, 2006). Entre essas três porções destaca-se a zona marginal, por ser considerada uma estrutura única, não encontrada em outros órgãos linfóides e com importante papel na resposta imune primária por ser principal local de ativação de células e formação destas células para o plasma (Cesta, 2006). A zona marginal também pode ser definida como a separação da polpa vermelha com a polpa branca e possui linfócitos B e macrófagos como principais constituintes (Mebius e Kraal, 2005).

A zona marginal recebe filamentos terminais do sistema arterial que juntamente com o sangue admite e reconhece antígenos que chega ao baço (Van Ewijk e Nieuwenhuis, 1985). Estudos apontam alta sensibilidade da zona marginal a produtos bacterianos a exemplo do

lipopolissacarídeo (LPS) (Groeneveld, Erich *et al.*, 1986; Kesteman, Vansanten *et al.*, 2008). O LPS é um dos componentes da parede das bactérias gram-negativas e provocam uma série de respostas imunológicas e bioquímicas (Eder, Vizler *et al.*, 2009). É considerado potente ativador do sistema imunológico induzindo reação inflamatória quando injetado nos tecidos (Eder, Vizler *et al.*, 2009) alterando a dinâmica das células imunocompetentes (De Smedt, Pajak *et al.*, 1996; Castro-Faria-Neto, Penido *et al.*, 1997).

Está bem estabelecido que a resposta leucocitária nos órgãos linfóides é determinada pelo estado nutricional (Hosea, Rector *et al.*, 2004) e que a desnutrição ocorrida nos períodos vulneráveis da vida como na gestação e na lactação pode gerar conseqüências para o organismo, como imunodeficiência (Landgraf, Tostes Rde *et al.*, 2007; Schuler, Gurmini *et al.*, 2008). Estudos com murinos mostram o efeito imunodepressor provocado pela desnutrição (Queiros-Santos, A. , 2000; Ferreira-E-Silva, 2002; Landgraf, Martinez *et al.*, 2005). Queiros-Santos (2000) verificou que a desnutrição neonatal provoca, na vida adulta, uma redução da liberação de radical superóxido por macrófagos e deficiência na resposta imunitária humoral (Queiros-Santos, A., 2000). Ferreira-e-Silva (2002) verificou uma redução no recrutamento de neutrófilos para os pulmões durante um processo inflamatório em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal (Ferreira E Silva, 2002). Landgraf *et al* (2005) observaram uma redução no número de leucócitos sanguíneos circulantes em ratos jovens, desnutridos no período gestacional (Landgraf, Martinez *et al.*, 2005). Assim, estas evidências sugerem que a desnutrição perinatal, mesmo após um período de aumento da ingestão de nutrientes, pode comprometer o mecanismo imunitário do organismo.

O déficit no sistema imunológico provocado pela desnutrição protéico-energética pode ser atenuado por fatores ambientais, como a prática de exercício físico (Dos Santos Cunha, Giampietro *et al.*, 2004). O estresse provocado pelo exercício físico é capaz de alterar a homeostase orgânica promovendo a reorganização das respostas imunológicas, alterando as células imunes de acordo com o estímulo recebido (Shephard e Shek, 1994; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Rosa e Vaisberg, 2002). Tais alterações sugerem uma interrelação do sistema imune com outros sistemas, como o nervoso e endócrino (Besedovsky, Del Rey *et al.*, 1985; Hodyl, Walker *et al.*, 2007).

O exercício físico a depender de sua magnitude parece ser um importante modulador da resposta imunológica (Rosa e Vaisberg, 2002; Drela, Kozdron *et al.*, 2004; Landgraf, Martinez *et al.*, 2005; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006), aumentando ou reduzindo a resposta imune, a depender da habilidade migratória dos leucócitos do sangue para a área de tecido inflamado (Shephard e Shek, 1994; Friman e Ilback, 1998; Pedersen e Hoffman-Goetz,

2000; Rosa e Vaisberg, 2002). A intensidade, duração e frequência do exercício desempenham papel-chave na determinação das respostas imunitárias a um esforço, podendo aumentar ou reduzir a função imunológica (Timmons, Tarnopolsky *et al.*, 2006).

A classificação do exercício físico quanto à intensidade pode ser leve, moderado e intenso, de acordo com parâmetros fisiológicos, como a concentração de lactato no sangue, o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) ou frequência cardíaca máxima ( $FC_{max}$ ) em resposta a teste de esforço (Silveira e Denadai, 2003; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). Quando o exercício físico é praticado regularmente é chamado de treinamento físico (Leandro, Manhaes De Castro *et al.*, 2007). Particularmente, o treinamento físico de intensidade moderada que corresponde ao  $VO_{2max}$  entre 50% a 70%, lactato 2 a 4 mmol/L e 60 a 79%  $FC_{max}$  (Silveira e Denadai, 2003) está associado a benefícios para a saúde (Nieman, Nehlsen-Cannarella *et al.*, 1990; Chakravarty, Godbole *et al.*, 2008; Newton e Galvao, 2008), como a melhora dos mecanismos de defesa do organismo, aumento da função de leucócitos (Lana, Paulino *et al.*, 2006) e à diminuição da suscetibilidade as doenças (Dos Santos Cunha, Giampietro *et al.*, 2004). Ferry *et al.* (1993) verificaram um aumento no percentual de linfócitos TCD4+ em animais treinados quando comparados aos seus pares sedentários (Ferry, Rieu *et al.*, 1993). Bacurau *et al.* (2000) observaram aumento da função linfocitária e da atividade fagocítica de macrófagos em animais treinados e inoculados com o tumor de Walker-256 (Bacurau, R. F., Belmonte, M. A. *et al.*, 2000). Nascimento *et al.* (2004) verificaram em ratos treinados após seis semanas de natação, um aumento na taxa de fagocitose de macrófagos (Nascimento, Cavalcante *et al.*, 2004). Levada-Pires *et al.* (2007) encontraram aumento da fagocitose e da produção de metabólitos reativos de oxigênio dos neutrófilos em ratos após 11 semanas de treinamento físico moderado (Levada-Pires, Lambertucci *et al.*, 2007).

Vários estudos indicam o efeito positivo do treinamento físico quando o sistema imunológico é desafiado (Nieman, Haapaniemi *et al.*, 2000). Por exemplo, Nascimento *et al.* (2004) verificaram que a leucopenia em resposta a um estresse agudo foi atenuada em ratos treinados. Leandro *et al.* (2006) verificaram a atenuação da diminuição do percentual de linfócitos de órgãos linfóides em resposta à contenção aguda em ratos treinados (60 minutos p/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas) (Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). Então, o treinamento físico de intensidade moderada parece promover adaptações fisiológicas e imunológicas, induzindo mecanismos adaptativos sobre as células de defesa (Bacurau, R.F., Belmonte, M.A. *et al.*, 2000) que repercutem de forma positiva no organismo. Com isso, os efeitos do treinamento físico sobre o sistema imunológico do animal desnutrido é uma questão de interesse.

Diante de tais evidências, a desnutrição no período crítico do desenvolvimento pode ser um agente estressor indutor de alterações tardias na resposta imunológica promovendo um déficit da função imunológica e o treinamento físico parece ter um papel modulador importante neste sistema. Assim, questionamos acerca da possível reversão dos efeitos da desnutrição fetal e neonatal em alguns aspectos da resposta imunológica em ratos adultos endotoxêmicos submetidos ao treinamento físico de intensidade moderada.



### 3. MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas 20 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar*, com peso corporal compreendido entre 180 g e 220 g e seus filhotes machos provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luzes das 06 às 18 h) e alojados em gaiolas de polipropileno com dimensão de 46x31x21 cm (CxLxA) com livre acesso a água e ração (Figura 1).

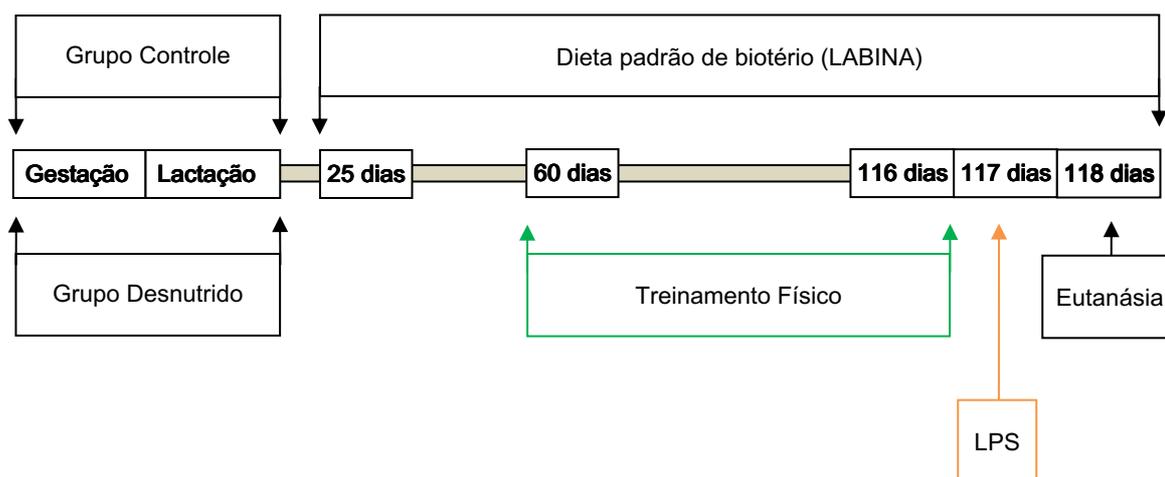


**Figura 1:** Acondicionamento dos animais em biotério sob condições padrões de temperatura, luminosidade e alimentação.

As ratas ainda virgens foram acasaladas (2 ratas para 1 macho). A gravidez foi confirmada pela presença de espermatozóide visualizado através de lâmina histológica montada contendo esfregaço vaginal. A seguir, as ratas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: controle (C, n=10, caseína a 17%) e desnutridas (D, n=10, caseína a 8%). Na lactação, as ratas permaneceram recebendo dieta experimental e a ninhada foi ajustada para 6 filhotes. No desmame (25 dias de idade) somente os filhotes machos (C<sub>f</sub>, n=24 e D<sub>f</sub>, n=24) permaneceram no experimento e receberam dieta equilibrada (74,5% de carboidratos, 23% de proteínas e 2,5% de lipídeos), enquanto que as fêmeas (mães e filhotes) foram sacrificadas por inalação de CO<sub>2</sub>. Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos de acordo com o protocolo de treinamento físico moderado: controle (C<sub>f</sub>, n=12), controle +

treinamento ( $T_f$ ,  $n=12$ ), desnutrido ( $D_f$ ,  $n=12$ ) e desnutrido + treinamento ( $DT_f$ ,  $n=12$ ). Após o protocolo de treinamento físico, os grupos foram subdivididos de acordo com a administração de lipopolissacérideo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil, 1mL/1Kg) ou solução salina: controle ( $C_f$ ,  $n=6$ ), controle + LPS ( $LPS_f$ ,  $n=6$ ), controle + treinamento ( $T_f$ ,  $n=6$ ), controle + treinamento + LPS ( $T+LPS_f$ ,  $n=6$ ), desnutrido ( $D_f$ ,  $n=6$ ), desnutrido + LPS ( $D+LPS_f$ ,  $n=6$ ) e desnutrido + treinamento ( $DT_f$ ,  $n=6$ ), desnutrido + treinamento + LPS ( $DT+LPS_f$ ,  $n=6$ ). Após 24 horas da administração de LPS, os animais foram sacrificados por exsanguinação (Figura 2).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE, sob protocolo número: 23076.000904/2009-01 (Anexo A) e seguiu as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) de acordo com a lei 9.605/98.



**Figura 2:** Desenho experimental representando a formação dos diferentes grupos (controle e desnutrido) quanto à manipulação da dieta, período de treinamento físico, administração de LPS e do sacrifício.

### 3.2 Manipulação da dieta durante a gestação e lactação

Durante a gestação e lactação, as ratas do grupo C receberam dieta a base de caseína a 17% enquanto o grupo D recebeu dieta hipoprotéica com 8% de proteína (tabela 1) (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993). Após o desmame, os filhotes receberam dieta padrão de biotério Labina (tabela 2).

**Tabela 1:** Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	94,12 g	200,00 g
Mix Vitamínico**	10,00 g	10,00 g
Mix Mineral***	35,00 g	35,00 g
Celulose	50,00 g	50,00 g
Bitartarato de Colina	2,50 g	2,50 g
DL-Metionina	3,00 g	3,00 g
Óleo de Soja	70,0 ml	70,0 ml
Amido de Milho	503,40g	503,40 g
Amido Dextrinizado	132,00 g	132,00 g
Sacarose	100,00 g	100,00 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

\*Quantidade para 1 kg de dieta.

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-ácido aminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

\*\* Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO<sub>4</sub>, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO<sub>4</sub>, 2000; Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 120; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 200; elementos traços, 400 (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 98; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 20; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40 g [per kg of diet]).

**Tabela 2:** Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada após o desmame

Ingredientes*	Quantidade (g)	Calorias (Kcal)
Proteína	23,0	92,0
Carboidratos	74,5	288,0
Gordura	2,5	22,5
Total	100,0	402,5

\*Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato de bicálcico, sal, pré-mix.

Fonte: Purina Brasil.

### 3.3 Protocolo de Treinamento Físico

A partir de 60 dias de idade, os animais treinados foram submetidos a um programa de treinamento físico moderado em esteira motorizada (EP-131®, Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Utilizou-se o protocolo experimental de treinamento físico moderado durante 8 semanas, 5 dias/semana, 60 minutos/dia a 70% do  $VO_{2max}$  de acordo com o protocolo de Leandro *et al.* (2007) (Leandro, Levada *et al.*, 2007) [Quadro1]. O grupo não treinado permaneceu nas gaiolas.

De acordo com o protocolo utilizado, a intensidade começa baixa e aumenta progressivamente a cada semana até atingir 70% de  $VO_{2max}$ , sendo mantida até o fim do programa de treinamento. Para isso manipulamos a velocidade, a inclinação da esteira e o tempo de exercício. A primeira semana de treinamento é dedicada somente à adaptação dos animais. A esteira funciona em baixa velocidade, 20 minutos/dia. A partir da segunda semana, o exercício assume duração de 60 minutos, sendo dividido em quatro fases: aquecimento (5min), intermediário (20min) que pode ser subdividida em duas etapas de 10 minutos com velocidades diferentes, treino (30min) e desaceleração (5min). Somente na fase de treino é atingido 70% de  $VO_{2max}$ .

**Quadro1:** Descrição do protocolo de treinamento físico de acordo com a velocidade, inclinação e duração de cada sessão das oito semanas de treinamento.

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

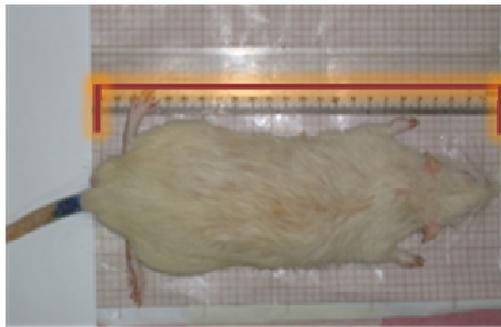
Fonte: LEANDRO *et al.*, 2007.

### 3.4 Indicadores somáticos

Os animais entre 21 a 63 dias de vida foram semanalmente medidos o peso corporal através de balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1kg e sensibilidade de 0,1g) (Figura 3) e o comprimento do eixo longitudinal do animal (ânus ao focinho) (Silva, Marinho *et al.*, 2005) (Figura 4) . A partir dos dados de peso (g) e comprimento (cm) calculou-se e o Índice de Massa Corporal (IMC) (Giugliano, Brevetti *et al.*, 2009) (Figura 5). Durante o período de treinamento físico continuou o registro do peso corporal dos animais semanalmente.



**Figura 3:** Ilustração da pesagem do animal



**Figura 4:** Ilustração do comprimento do eixo longitudinal do animal

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso}}{\text{Comprimento}^2}$$

**Figura 5:** Cálculo do Índice de Massa Corporal do animal

### 3.5 Administração de Lipopolissacarídeo (LPS)

Finalizado o período de treinamento, os animais foram novamente divididos de acordo com administração ou não de Lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil). O

LPS foi administrado por meio de injeção intra-peritoneal na dosagem de 1mL/1Kg. Os animais que não tratados com LPS receberam solução salina (0,9% de NaCl) na mesma dosagem.

Em seguida os animais foram anestesiados (uretana 12,5 mg, cloralose 0,5 mg, 1mL/100g de peso corporal do animal) e submetidos à eutanásia para a retirada dos tecidos (figura 2).

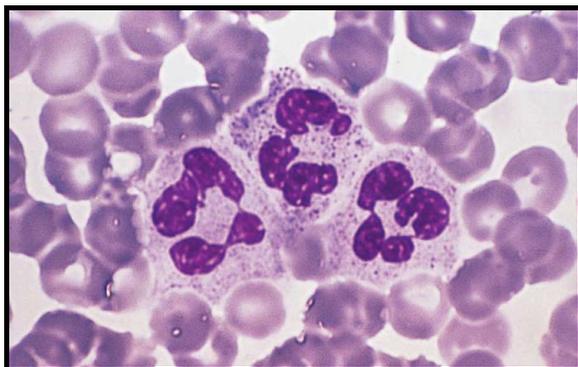
### **3.6 Retirada dos Tecidos**

#### **3.6.1 Contagem diferencial de leucócitos do sangue**

Cerca de 5 mL de sangue foi coletado através de punção cardíaca. Para isso foram utilizados seringas e tubos heparinizados (etilenodiaminotetracético – EDTA). Destes, uma alíquota foi utilizada para contagem diferencial de leucócitos e o restante foi centrifugado (10 min, 231 g, 4°C) para obtenção do plasma e congelados em tubos eppendorf (a -80° C) para posterior análise bioquímica.

Para contagem diferencial de leucócitos foi utilizada a técnica do esfregaço sanguíneo. Para fixação e coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB (Laborclin Ltda.São Paulo, Brasil). Depois de seca, a lâmina foi examinada ao microscópio óptico (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) com objetiva de 100x sob imersão. Os diferentes tipos de leucócitos foram quantificados em um contador eletrônico de células sanguíneas (Kacil, mod. CC502). Foram contados os granulócitos, linfócitos e monócitos sanguíneos, adotando as seguintes características morfológicas:

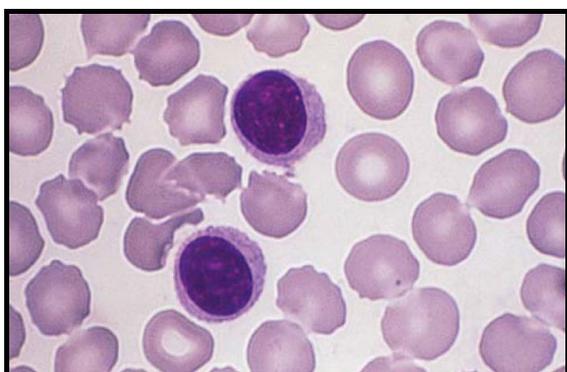
- Granulócitos ou segmentados: incluiu neutrófilos e eosinófilos. Apresentam-se esféricamente com núcleo formado por dois a cinco lóbulos interligados (Figura 6 e 7).
- Linfócitos: tamanho pequeno (menores que os monócitos), citoplasma escasso ou não visível, núcleo arredondado contendo cromatina espessa (Figura 8).
- Monócitos: núcleo ovóide, em forma de rim ou ferradura, de tonalidade mais clara que os linfócitos e citoplasma basófilo e contém grânulos azurófilos que garante o tom acinzentado do citoplasma (Figura 9).



**Figura 6:** Três neutrófilos e vários eritrócitos. Cada neutrófilo com um núcleo com diversos lóbulos. Coloração pelo Giemsa.



**Figura 7:** Fotomicrografia de um eosinófilo. Núcleo bilobulado, granulos citoplasmáticos. Coloração pelo Giemsa.



**Figura 8:** Dois linfócitos. Núcleo arredondado e citoplasma sem granulos específicos. Coloração pelo Giemsa.



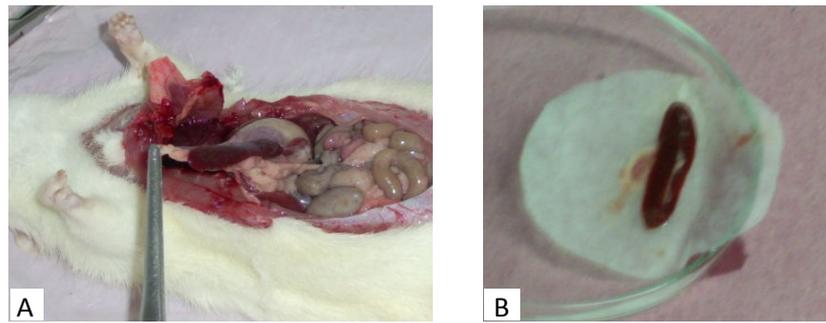
**Figura 9:** Fotomicrografia de um Monócito. Núcleo em forma de rim. Coloração pelo Giemsa.

Figuras disponíveis em: <http://www.scribd.com/doc/15723727/Imagens-Histologia-Basica-2>, acessado em 22/11/09, às 18:09h.

### 3.6.2 Baço

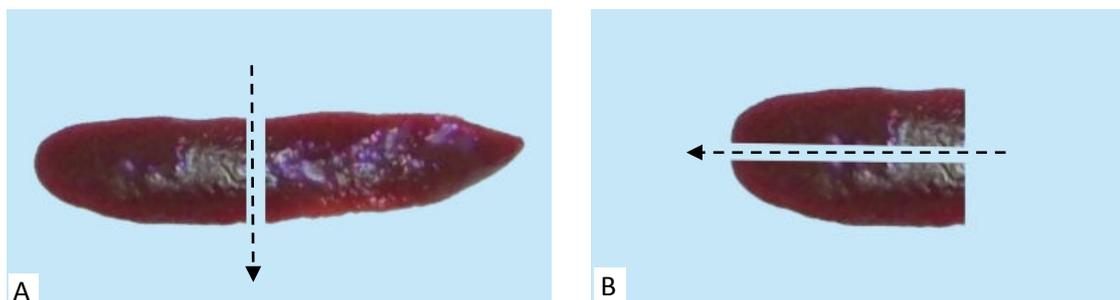
#### 3.6.2.1 Extração do baço

O baço foi extraído cuidadosamente utilizando tesoura e pinça cirúrgicas (Figura 10A). Após a extração, o baço foi colado em retalho de papel filtro e imerso em Formalina a 10% tamponada em solução tampão de fosfato de sódio (PBS a 0,01M e pH 7,2) por 10 min (Figura 10B).



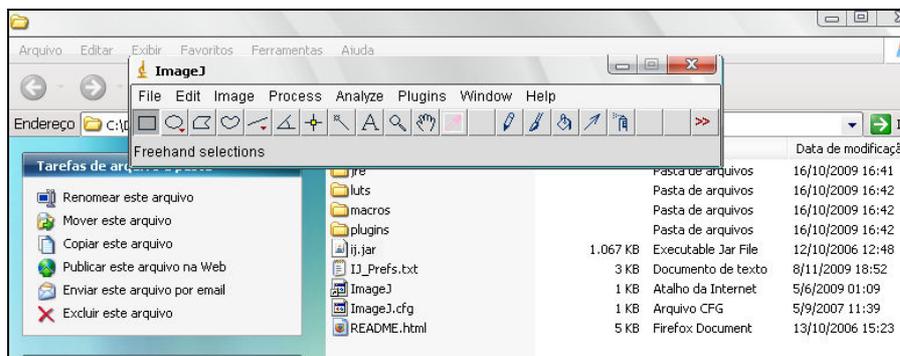
**Figura 10:** Procedimento de extração do baço. A – Localização e remoção do baço. B – Imersão do baço em Formalina a 10% tamponada em solução tampão de fosfato de sódio.

Em seguida, o baço foi lavado utilizando solução salina (0,9% de NaCl) e feito corte único transversalmente próximo ao hilo (Figura 11A). Posteriormente, as duas metades do baço foram colocadas em recipiente fechado contendo Formalina a 10% tamponada em PBS por até 48 horas antes da rotina histológica. Uma das metades do baço foi seccionada ao meio (Figura 11B) e um dos fragmentos de tamanho igual entre os grupos foi utilizado para processo histológico (desidratação em bateria crescente de alcoóis: 70°, 80°, 90° e 100°, diafanização em xilol, imersão e inclusão em parafina) (Veiga, Melo-Júnior *et al.*, 2007). O bloco de parafina foi seccionado em micrótomo horizontal (4 $\mu$ m) [Yamato Koki, Japan] e montado uma preparação histológica, corada com Hematoxilina-Eosina. Com as preparações histológicas do baço foi realizado contagem de folículo linfóide esplênico e análise morfométrica desses folículos e da zona marginal do baço.

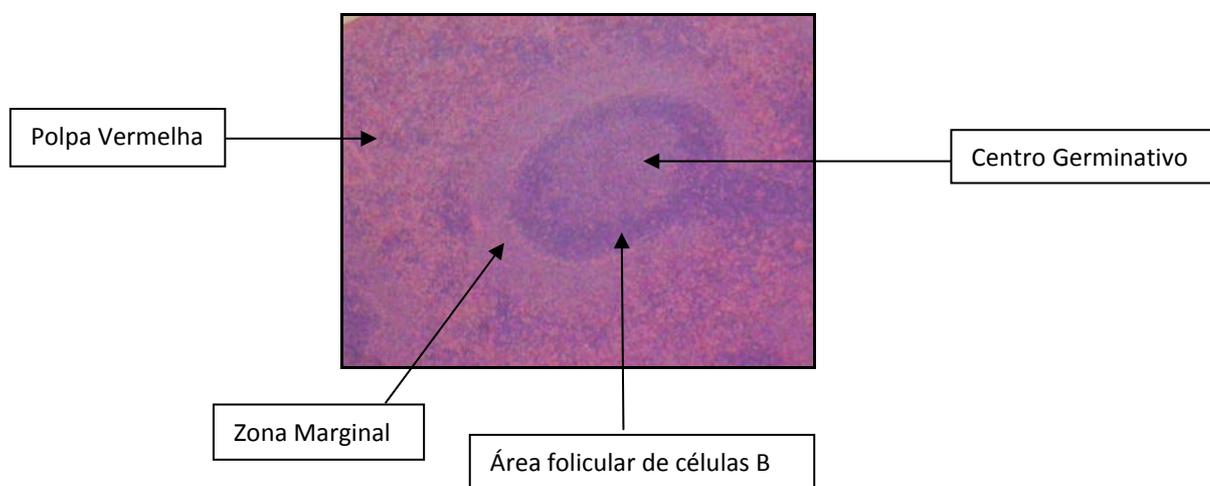


**Figura z:** Representação dos cortes no baço. A - Corte transversal próximo ao hilo dividindo o baço em duas metades. B – Corte longitudinal dividindo a metade do baço ao meio.

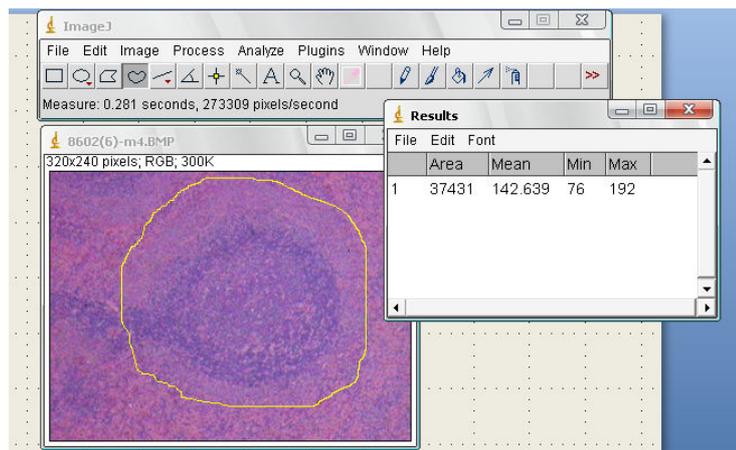
Para análise morfométrica foram obtidas imagens digitalizadas das preparações histológicas do baço utilizando-se uma microcâmara Motic® acoplada ao microscópio óptico (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) com aumento de 400x. As imagens foram analisadas pelo programa de morfometria ImageJ 1.37v® unidade pixels (Figura 12). Primeiro foi identificada a zona marginal que corresponde a um anel formado por uma trama de células entre a polpa vermelha e a polpa branca, cercando o folículo de células B (região mais escura de células que internamente pode ou não ser visualizado um centro germinativo) (Figura 13). Após a identificação foi mensurado através do programa ImageJ 1.37v® o limite externo e interno da zona marginal, a diferença dessas duas medidas resultou na área ocupada pela zona marginal (Figura 14 e 15). Considerou-se a área interna da zona marginal como o tamanho do folículo linfóide esplênico (Figura 15).



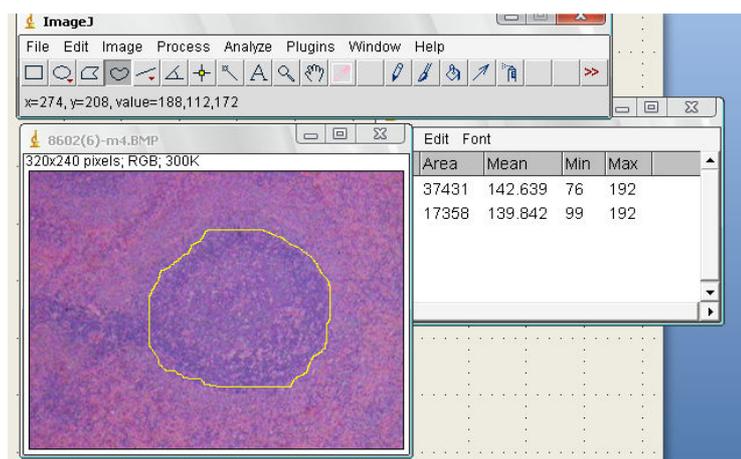
**Figura 12:** Ilustração do programa de morfometria utilizado, ImageJ 1.37v®.



**Figura 13:** Ilustração topográfica do baço em polpa vermelha, zona marginal e polpa branca representada pelo folículo linfóide (área folicular de células B e Centro germinativo).



**Figura 14:** Ilustração do limite externo da zona marginal mensurada pelo programa ImageJ 1.37v®.



**Figura 15:** Ilustração do limite interno da zona marginal mensurado pelo programa ImageJ 1.37v®.

Para a contagem de folículos esplênicos foi determinada em cada lâmina histológica uma extensão de 1,5 cm para análise, partindo da superfície de corte próximo ao hilo para a periferia do baço. A contagem foi realizada através de microscópio óptico (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) com aumento de 100x e contador manual.

### 3.7 Análise estatística

Os valores foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Para avaliação do Peso, Comprimento e o IMC foram utilizados o teste ANOVA two-way, seguido do teste

de Bonferroni. Para a comparação entre os grupos com relação à análise de parâmetros morfológicos, número de folículos e porcentagem de leucócitos no sangue foram utilizados o teste ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas. O nível de significância foi mantido em 5%. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.0 para Windows.

## **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ARTIGO ORIGINAL

**Título:** Efeito do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição perinatal

**Running title:** Treinamento físico altera a morfometria esplênica

**Autores:**

Luanna Moita<sup>1</sup>

Marinaldo Freire Lustosa<sup>2</sup>

Amanda Theresa Tobias Silva<sup>3</sup>

Roberto José Vieira de Melo<sup>4</sup>

Raul Manhães de Castro<sup>5</sup>

Nicodemos Teles de Pontes Filho<sup>4</sup>

Carol Góis Leandro<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduanda em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>2</sup> Graduando do Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>3</sup> Graduanda do Curso de Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>4</sup> Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>5</sup> Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco

<sup>6</sup> Núcleo de Nutrição, Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco

Número de palavras: 4.344

Subject área: Human / environmental and exercise physiology

**Endereço para correspondência:**

Luanna Moita

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde, Avenida Professor Moraes Rego, s/n Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE Brasil

Email: luanamoita@oi.com.br ou luannamoita@yahoo.com

## Resumo

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição perinatal. Ratos machos Wistar foram divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida às mães: controle (caseína a 17%, n=24) e desnutridos (caseína a 8%, n=24). Após o desmame, os animais passaram a receber dieta equilibrada. Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos com relação ao treinamento físico moderado: controle (C, n=12), treinamento físico (T, n=12), desnutrido (D, n=12) e desnutrido + treinamento físico (DT, n=12). O protocolo de treinamento foi realizado em esteira ergométrica durante 8 semanas (5 dias/sem, 60 min/dia a 70% do  $VO_{2max}$ ). Após 24h do final do protocolo de treinamento, metade dos animais de cada grupo recebeu injeção intra-peritoneal de Lipopolissacarídeo (LPS), enquanto seus pares receberam injeção de solução salina. Foram registradas as mudanças dos indicadores somáticos, do percentual de leucócitos no sangue, do número e tamanho dos folículos linfóides e do tamanho da zona marginal esplênica. A contagem diferencial de leucócitos circulantes foi realizada através de esfregaço sanguíneo corada com o kit panótico rápido, a contagem e a morfometria dos folículos esplênicos e da zona marginal foram estudadas por microscopia óptica. Na contagem diferencial de células do sangue não houve diferença com relação à desnutrição perinatal e ao treinamento físico moderado. Os animais desnutrido apresentaram menor número de folículos linfóides em relação ao grupo C. O treinamento físico induziu aumento do número de folículos no grupo desnutrido. O grupo D+LPS apresentou menor percentual de aumento da área folicular comparado ao grupo C+LPS. Os animais treinados apresentam aumento da área folicular e da zona marginal em menor proporção quando comparado aos seus controles não treinados. O treinamento favoreceu a capacidade de defesa do organismo por aumentar o número de folículos e por atenuar a intensidade da resposta orgânica aguda à situação de infecção, induzindo na resposta imune um mecanismo conhecido como tolerância cruzada.

Palavras Chaves: desnutrição protéica, folículo linfóide, LPS

## Introdução

A falta ou deficiência de nutrientes está associada a uma maior predisposição a doenças infecciosas e a morte precoce em populações de baixa-renda (Moore, Cole *et al.*, 1999; Van De Poel, Hosseinpoor *et al.*, 2008). De fato, a desnutrição tem sido considerada

como fator causal no aumento da susceptibilidade a infecções em sujeitos normais ou pacientes hospitalizados (Huang, 2001). Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que a ineficiência da resposta imunológica em adultos pode também estar associada à desnutrição ocorrida nas fases de gestação e lactação, chamadas de períodos críticos do desenvolvimento (West, 2002). Este fenômeno biológico é chamado de *programação* onde estímulos ambientais ocorridos durante as fases de desenvolvimento do organismo alteram estruturas e funções de tecidos com repercussões na vida adulta (Lucas, 1991).

Em humanos, a desnutrição neonatal está associada a uma menor produção de linfócitos T no timo, déficit da resposta celular e humoral e menor resposta de anticorpo às vacinas específicas (Mcdade, Beck *et al.*, 2001; Prentice e Moore, 2005; Moore, Collinson *et al.*, 2006). Em ratos gravemente desnutridos (4% de proteínas) e infectados com LPS, ocorreu uma diminuição na população de leucócitos do sangue e uma menor ativação de macrófagos peritoneais como também redução da quantidade de macrófagos na medula óssea e no baço (Fock, Vinolo *et al.*, 2007). É provável que a deficiência de um nutriente específico (como, proteína) da dieta no período crítico do desenvolvimento influencie a capacidade de defesa do organismo, possivelmente por alterar o desenvolvimento dos componentes do sistema imune, principalmente os órgãos linfóides secundários, como o baço.

O baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo e o único interposto na circulação sangüínea. Possui uma rede de folículos linfóides por onde circulam os linfócitos B, TCD4+ e TCD8+, e células apresentadoras de antígeno (Torres, 2000; Altamura, Caradonna *et al.*, 2001). Em torno dos folículos linfóides encontra-se a zona marginal, considerada uma estrutura única não encontrada em outros órgãos linfóides e com importante papel na resposta imune primária por ser o principal local de apresentação de antígenos aos linfócitos, com posterior formação de plasmócitos e linfócitos T efetores (Cesta, 2006).

A resposta imunológica é estereotipada e envolve a participação dos sistemas nervoso e endócrino por meio da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo, resultando na liberação de hormônios com papel modulador sobre os órgãos linfóides e sobre as células imunes (Besedovsky, Del Rey *et al.*, 1985; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). O exercício físico (EF) é um modelo de estresse, ativa o eixo HPA e o sistema nervoso simpático, exercendo assim efeitos moduladores sobre as células imunocompetentes (Leandro, De Lima *et al.*, 2007). Diferentes tipos e cargas de EF podem provocar alterações distintas nos parâmetros imunes (Keast, Cameron *et al.*, 1988). Estudos mostram que o EF moderado (<60% do  $VO_{2máx}$ ) melhora os mecanismos de defesa,

principalmente quando praticado regulamente ao longo de um período, treinamento físico (Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006).

Diante do exposto, o presente estudo irá testar duas hipóteses: (1) a desnutrição perinatal diminui o número e tamanho de estruturas linfóides do baço de animais adultos e endotoxêmicos; e (2) o treinamento físico moderado reverte os efeitos da desnutrição perinatal sobre as estruturas avaliadas. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do treinamento físico moderado na morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos e que foram submetidos à desnutrição perinatal.

## Métodos

### *Animais e dieta*

Ratos machos *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e mantidos em biotério de experimentação com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , ciclo claro-escuro de 12/12 horas com livre acesso a água e ração. Os ratos foram divididos em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida às mães durante a gestação e lactação: controle (caseína a 17%, n=24) e desnutridos (caseína a 8%, n=24) (Tabela 1). Após o desmame, os animais passaram a receber dieta equilibrada (Labina) (Tabela 2). Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos com relação ao treinamento físico moderado: controle (C n=12), controle + treinamento físico (T n=12), desnutrido (D, n=12) e desnutrido + treinamento físico (DT, n=12). O protocolo de treinamento foi realizado em esteira ergométrica durante 8 semanas (5 dias/sem, 60 min/dia a 70% do  $\text{VO}_{2\text{max}}$ ). Após 24h do final do protocolo de treinamento, metade dos animais de cada grupo recebeu injeção intra-peritoneal de Lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brasil, 1 ml/Kg). Os demais ratos receberam injeção de solução salina (0,9% de NaCl, 1 ml/Kg), formando os seguintes grupos com 6 componentes cada: Controle (C), Controle+LPS (C+LPS), Desnutrido (D), Desnutrido+LPS (D+LPS), Treinado (T), Desnutrido Treinado (DT), Desnutrido Treinado+LPS (DT+LPS). Após 24horas da administração de LPS, os animais foram sacrificados por exsanguinação. Foram registradas as mudanças dos indicadores somáticos, do percentual de leucócitos no sangue, do número e de tamanho dos folículos esplênicos e do tamanho da zona marginal. O experimento foi aprovado pelo comitê de ética em Experimentação Animal da UFPE, protocolo número: 23076.000904/2009-01.

### *Protocolo de Treinamento*

O protocolo de treinamento físico consistiu em corrida em tapete ergométrico (Esteira Motorizada EP-131®, Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil), durante 8 semanas, 5 dias/semana, 60 minutos/dia a 70% do  $VO_{2max}$  de acordo com o protocolo de Leandro *et al.* (2007) (Leandro, Levada *et al.*, 2007).

### *Indicadores somáticos*

O peso corporal e o comprimento naso-anal dos animais entre 21 a 60 dias foram semanalmente acompanhados. O peso corporal foi avaliado em balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1kg e sensibilidade de 0,1g). A partir dos dados de peso (g) e comprimento (cm) calculou-se o Índice de Massa Corporal (IMC). Durante o período de treinamento físico, o peso corporal dos animais foi registrado semanalmente.

### *Extração dos tecidos*

Aos 118 dias de idade, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (uretana 12,5 mg, cloralose 0,5 mg, 1mL/100g de peso corporal do animal). Foi realizada punção cardíaca e uma alíquota de 10  $\mu$ L foi utilizada para contagem diferencial de leucócitos do sangue através da técnica de esfregaço sanguíneo. Após a fixação e coloração do esfregaço (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda.São Paulo, Brasil), os diferentes tipos de leucócitos foram quantificados com auxílio de microscópio óptico, objetiva de 100x sob imersão (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) e contador eletrônico de células sanguíneas (Kacil, mod. CC502).

A seguir, o baço foi extraído cuidadosamente. Após a extração, foi feito corte único transversal próximo ao hilo. Posteriormente, as duas metades do baço foram recolocadas em Formalina a 10% tamponada em PBS por até 48 horas antes da rotina histológica. Uma das metades do baço foi seccionada ao meio e um dos fragmentos de tamanho igual entre os grupos foi utilizado para processo histológico.

### *Contagem de Foliculos linfóides do baço*

Para avaliar o número de foliculos foram utilizadas preparações histológicas coradas pela hematoxilina e eosina (HE). Em cada preparação foi determinada uma extensão de 1,5 cm para análise, partindo da superfície de corte próximo ao hilo para a periferia do baço. A contagem dos foliculos foi feita através de microscópio óptico (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) com aumento de 100x e contador manual.

### *Tamanho da zona marginal e do folículo linfóide do baço*

Para as análises morfométricas foram obtidas imagens digitalizadas das preparações histológicas do baço utilizando-se uma microcâmera Motic® acoplada ao microscópio óptico (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda) com aumento de 400x. As imagens foram analisadas pelo programa de morfometria ImageJ 1.37v® unidade pixels. Mensurou-se o limite externo e interno da zona marginal, sendo a diferença entre essas duas medidas determinante da área ocupada pela zona marginal. Definiu-se o limite interno da zona marginal para medida da área do folículo linfóide esplênico.

### *Análise Estatística*

Os valores foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Para avaliação do peso, comprimento e o IMC foram utilizados o teste ANOVA two-way, seguido do teste de Bonferroni. Para a comparação entre os grupos com relação ao número e tamanho de folículos, tamanho da área da zona marginal e contagem de leucócitos do sangue foram utilizados o teste ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey de comparações múltiplas com nível de significância mantido em 5%.

## **Resultados**

### *Características dos filhotes*

Nas avaliações de peso corporal, comprimento naso-anal e IMC realizadas nas idades de 21 a 63 dias de vida, os animais do grupo desnutrido apresentaram valores menores nos parâmetros avaliados em relação ao grupo controle (Figura 1A, B e C).

Durante o período de treinamento físico, o grupo desnutrido manteve menor peso corporal em relação ao grupo desnutrido treinado (Figura 2).

### *Células do sangue*

Em relação à contagem diferencial de células do sangue, não houve diferença quanto à desnutrição precoce e ao treinamento físico quando os grupos experimentais foram comparados aos seus respectivos controles (Figura 3 A, B, C). Por outro lado, em resposta ao estímulo com LPS, todos os grupos experimentais apresentaram neutrofilia e linfopenia. Entre

os endotoxêmicos, o grupo desnutrido apresentou maior percentual de aumento de neutrófilos, contudo, o grupo desnutrido treinado apresentou um menor percentual de neutrofilia (C+LPS= 237,5%, D+LPS= 382,6%, T+LPS= 114,6%, DT+LPS= 84,5%) (Figura 3A). Da mesma forma, os grupos desnutrido e desnutrido treinado apresentaram uma menor queda no número de linfócitos (C+LPS= -42,0%, D+LPS= -39,6%, T+LPS= -42,9%, DT+LPS= -28,32%) (Figura 3B). Todos os grupos apresentaram um aumento na contagem de monócitos, exceto o grupo desnutrido que houve uma queda (C+LPS= 107,4%, D+LPS= -20,3%, T+LPS= 57,9%, DT+LPS= 140,6%) (Figura 3C).

#### *Número de Foliculos linfóides do Baço*

Na contagem do número de foliculos linfóides esplênicos, os animais do grupo desnutrido apresentaram um menor número quando comparados ao seu controle. Já o grupo treinado apresentou aumento do número de foliculos em relação ao grupo controle (Figura 4).

Em resposta ao estímulo com LPS, houve aumento do número de foliculos em todos os grupos quando comparado ao seu controle. O grupo desnutrido apresentou um maior incremento no número de foliculos (47,4%) quando comparado aos demais grupos (Figura 4). Também houve aumento do número de foliculos no grupo desnutrido treinado com LPS em relação ao grupo desnutrido com LPS e quanto ao grupo desnutrido treinado e, no grupo desnutrido treinado em relação ao grupo desnutrido (Figura 4).

O treinamento físico em animais adultos endotoxêmicos desnutridos atenuou o percentual de aumento do número de foliculos quando comparado ao seu controle não treinado (D+LPS= 47,4% e DT+LPS= 23,2%) (Figura 4).

#### *Tamanho dos Foliculos linfóides do Baço*

Na análise morfométrica dos foliculos linfóides, os grupos desnutrido e treinado apresentaram maior área folicular quando comparados ao grupo controle (C=8911±232, D=11534±454 e T= 13079±795 p<0,05) (Figura 5). Em resposta ao estímulo de LPS, o grupo desnutrido apresentou aumento da área dos foliculos em menor proporção que o grupo controle (C+LPS= 56,1% e D+LPS = 13,7%) (Figura 5). Por outro lado, ainda em resposta ao estímulo de LPS, o grupo desnutrido treinado apresentou aumento da área folicular em maior proporção quando comparado ao seu controle (T+LPS= 6,9% e DT+LPS= 8,4%) (Figura 5).

Os animais treinados apresentaram aumento da área folicular em resposta ao LPS em menor proporção quando comparados aos seus controles (C+LPS= 56,1%, T+LPS= 6,9%, D+LPS= 13,7% e DT+LPS= 8,4%) (Figura 5).

### *Tamanho da zona marginal esplênica*

Na análise morfométrica do baço, os animais do grupo desnutrido apresentaram valores menores da zona marginal quando comparados aos animais grupo controle (C=12431±731 e D=10407±893,  $p>0,05$ ). Após o estímulo de LPS, os animais do grupo desnutrido apresentaram um aumento da área da zona marginal (C+LPS = 29,12% e D+LPS = 47,48%) (Figura 6).

Entre os animais endotoxêmicos, os treinados apresentaram percentual de aumento da área da zona marginal inferior aos não treinados (C+LPS= 29,12%, T+LPS= 11,76%, D+LPS= 47,48% e DT+LPS= 12,71%) (Figura 6).

### **Discussão**

A manipulação da quantidade de proteínas da dieta durante a gestação e lactação é um modelo de desnutrição bem estabelecido e utilizado em estudos sobre programação fetal de doenças metabólicas da vida adulta (Barker, 2007; De Moura, Lisboa *et al.*, 2007; Gluckman, Seng *et al.*, 2007) . Da mesma forma, vários estudos têm demonstrado que o treinamento físico moderado está associado com aumento da aptidão cardiorrespiratória, da taxa metabólica (redução do peso corporal), da massa magra e melhora da função imune (Leandro, De Lima *et al.*, 2007; Leandro, Levada *et al.*, 2007) No presente estudo, verificamos as repercussões da desnutrição perinatal e do treinamento físico de intensidade moderada em alguns aspectos da morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos por LPS.

Os animais desnutridos no início da vida apresentaram déficits em indicadores somáticos corroborando com estudos prévios que utilizaram um modelo experimental semelhante (Lopes De Souza, Orozco-Solis *et al.*, 2008; Orozco-Solis, Lopes De Souza *et al.*, 2009). O déficit sobre a evolução ponderal da prole está associado com o baixo estoque de nutrientes da mãe e, conseqüentemente a menor transferência de nutrientes para a prole repercutindo negativamente no crescimento de órgãos que se encontram em fase de crescimento rápido (Barker, 2007). Passos *et al.* 2000 demonstraram que a restrição protéica (8% de proteína) durante a lactação provoca alterações no volume e na composição do leite das ratas lactantes com repercussões no ganho de peso da prole (Passos, Ramos *et al.*, 2000). Além disso, a desnutrição perinatal parece induzir modificações na expressão de mRNA do hormônio do crescimento contribuindo para a diferença nos padrões somáticos da prole na vida adulta (De Moura, Lisboa *et al.*, 2007).

A partir dos 60 dias de vida, os animais foram submetidos a treinamento físico moderado em esteira ergométrica por 8 semanas. Durante esse período, os animais desnutridos treinados apresentaram menor peso corporal em relação aos animais desnutridos não treinados. O menor peso corporal do grupo desnutrido treinado ao longo do treinamento pode ser atribuído ao processo de perda de massa gorda não compensada pelo ganho de massa magra. Um estudo com animais verificou que em resposta ao treinamento físico, há um aumento da massa magra e diminuição do estoque de tecido adiposo em animais treinados (Silveira, Fiamoncini *et al.*, 2008). Apesar de não avaliarmos o percentual de massa magra e gorda, esse efeito pode explicar a diferença ponderal entre os animais.

Em animais desnutridos, não houve alteração na contagem diferencial de leucócitos do sangue. Landgraf et al (2007) observaram uma redução na contagem total e diferencial de leucócitos do sangue em animais jovens (56 e 63 dias de idade) submetidos à desnutrição na gestação (consumo de 50% da dieta dos animais controles) (Landgraf, Tostes Rde *et al.*, 2007). No presente estudo, avaliamos animais aos 118 dias de vida, época de total maturação dos sistemas fisiológicos.

O treinamento físico moderado, por si só, também não alterou o número relativo das células imunes em circulação. Corroborando com estudos que utilizaram protocolo de treinamento físico moderado de 8 semanas (Kim, Shin *et al.*, 2003; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). A dinâmica de leucócitos na circulação está relacionada a liberação de hormônios do eixo HPA (Besedovsky, Del Rey *et al.*, 1985). Uma vez que o exercício físico é um modelo de estresse, há uma maior concentração de glicocorticóides circulantes alterando o número de leucócitos (Besedovsky, Del Rey *et al.*, 1985). Contudo, o treinamento físico provoca adaptação desse eixo, reduzindo a sensibilidade da adrenal ao ACTH o que justifica os níveis inalterados de glicocorticóides, e por consequência, a não alteração de leucócitos circulantes (Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006).

A desnutrição perinatal alterou os parâmetros morfométricos do baço de ratos adultos, induzindo diminuição do número de folículos linfóides, aumento do tamanho desses folículos e uma tendência a diminuir o tamanho da zona marginal. O comprometimento das estruturas avaliadas parece ter decorrido do impacto nutricional durante o desenvolvimento do sistema imune, tanto pela carência de nutrientes como por desequilíbrio hormonal (como glicocorticóides), afetando eventos como gênese dos órgãos linfóides e expansão das populações de leucócitos (Klasing, 1998; Langley-Evans e Carrington, 2006; Savino, Dardenne *et al.*, 2007), induzindo déficit na microanatomia esplênica.

Em ratos, um estudo verificou redução do número de leucócitos esplênicos tanto em valor absoluto como relativo induzida por desnutrição moderada e severa durante a lactação (Cortes-Barberena, Gonzalez-Marquez *et al.*, 2008). Em humanos, Rubhana Raqib *et al.* (2007) reportaram uma baixa reserva de estruturas imunes em crianças com idade aproximada de 5 anos nascidas com baixo peso (Rubhana Raqib, 2007). O mecanismo subjacente da redução do número de leucócitos pode estar relacionado com: a redução da capacidade proliferativa nos órgãos linfóides primários ou ainda pela apoptose aumentada de linfócitos (Betancourt, Ortiz *et al.*, 1992; Ortiz, Cortes *et al.*, 2001) afetando posteriormente os demais órgãos linfóides.

Em nosso trabalho o treinamento físico moderado aumentou o número de folículos linfóides esplênicos. O que pode significar aumento do número de leucócitos para imunidade inata e adaptativa (Medzhitov e Janeway, 1998). Esse resultado mostra-se favorável para os animais treinados desnutridos por compensar o déficit do número de folículos. O aumento de folículos pode estar relacionado com aumento da atividade proliferativa de células imunes estimulada pelo treinamento físico. Em um estudo com ratos treinados (natação, 5 dias por semana durante 10 semanas) houve um aumento da atividade proliferativa de linfócitos no baço (Kwak, 2006).

Os animais submetidos à desnutrição perinatal apresentaram também folículos com tamanhos maiores que os animais do grupo controle, evidenciando o efeito programador da desnutrição em alterar a morfologia do baço com possíveis repercussões na função. Schreuder *et al.*, (2006) verificaram que a restrição alimentar no início da vida alterou o número e a forma dos glomérulos no rim. Os animais submetidos à desnutrição apresentaram redução do número, porém com alargamento dos glomérulos, evidenciando um mecanismo compensatório sobre a reserva deficitária de néfrons (Schreuder, Nyengaard *et al.*, 2006).

Para observar alterações na dinâmica de leucócitos do sangue, é preciso estimular o sistema imunológico. No presente estudo, induzimos endotoxemia nos animais com lipolissacarídeo (LPS), um dos componentes da parede das bactérias gran-negativas (Anane, Bellissant *et al.*, 2005). O LPS é considerado um ativador potente do sistema imunológico alterando a dinâmica de leucócitos e induzindo reação inflamatória sistêmica (Eder, Vizler *et al.*, 2009). Seu poder imunogênico pode ser atribuído a capacidade de ativar monócitos/macrófagos a produzirem citocinas inflamatórias incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1 e IL-6) que ativam o eixo HPA para manter a homeostase diante do quadro de infecção (Rivier, Chizzonite *et al.*, 1989). No baço, estudos anteriores mostraram que a estimulação com LPS provoca ativação intensa de células como

macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Groeneveld, Erich *et al.*, 1986; Zandvoort e Timens, 2002; Aoshi, Zinselmeyer *et al.*, 2008).

Em animais endotoxêmicos, a contagem relativa de leucócitos do sangue aponta para quadro típico de infecção aguda, com neutrofilia e linfopenia. O aumento súbito de neutrófilos pode ser explicado mais especificamente pela elevação dos níveis de agentes quimiotáticos na circulação, liberados pelos mastócitos e basófilos e pela ativação do sistema complemento, que atraem neutrófilos na fase aguda do processo inflamatório (Mabbott, 2004). Estudos também reportam após o estímulo do LPS uma queda quantitativa de neutrófilos na medula óssea, indicando mobilização intensa destes para o sangue, o que contribui para a neutrofilia no plasma (Bozza, Castro-Faria-Neto *et al.*, 1994).

Já a linfopenia também está relacionada aos níveis aumentados de citocinas, como também de óxido nítrico e glicocorticóides acelerando a apoptose, desta forma diminuindo o número de linfócitos circulantes (Hotchkiss, Coopersmith *et al.*, 2005).

A reatividade dos leucócitos ao estímulo do LPS é verificada na circulação e no órgão linfóide. No baço, o LPS estimulou o aumento do número de folículos. O aumento quantitativo de folículos linfóides em resposta ao LPS é compreendido ao considerar seu poder imunogênico. Nos animais desnutridos o aumento do número de folículos foi elevado e pode estar relacionado com dois fatores: déficit quantitativo de folículos, e, comprometimento da função leucocitária, mostrada em pesquisas recentes, porém com células de outros tecidos (Ferreira, Galvao *et al.*, 2009). A desnutrição perinatal diminui a capacidade de produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares de ratos adultos (Ferreira, Galvao *et al.*, 2009). Landgraf *et al.* (2005) encontraram menor poder migratório de leucócitos do sangue em animais jovens desnutridos durante a gestação (Landgraf, Martinez *et al.*, 2005).

O aumento da área folicular foi superior nos animais desnutridos comparado aos desnutridos treinados. Isso pode ser atribuído ao efeito estimulador do treinamento em melhorar mecanismos imunológicos, e em diminuir fatores inflamatórios, por exemplo, pela redução da expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Kizaki, Takemasa *et al.*, 2008). Dispensando assim uma maior quantidade de folículos para restabelecer a homeostase. Ademais, a reatividade inflamatória elevada pode representar um ponto negativo para o organismo por estar relacionada com doenças inflamatórias crônicas (Gleeson, Mcfarlin *et al.*, 2006).

O folículo linfóide foi sensível a desnutrição perinatal, ao LPS e ao treinamento físico, reagindo com aumento da área folicular. Nos animais endotoxêmicos, o grupo desnutrido apresentou menor percentual de aumento do tamanho folicular quando comparado ao seu

controle. Esse resultado pode ter ocorrido devido ao aumento prévio da área folicular programada pela desnutrição. Déficit das células imunes em decorrência da desnutrição pode ser uma hipótese alternativa. O treinamento de intensidade moderada mostrou estimular as células dos animais desnutridos por promover um aumento no percentual da área folicular em relação ao grupo treinado com LPS.

Em consequência da desnutrição, houve uma tendência de menor tamanho da zona marginal. Por outro lado, este compartimento mostrou aumentar após estimulação com LPS. Além da maior atividade leucocitária pelo poder imunogênico do LPS, esse resultado parece envolver mecanismos que induzem a permanência das células na zona marginal. Por exemplo, a baixa expressão de receptores (S1P1 e S1P3) que regulam a redistribuição das células B da zona marginal para zona folicular e, o aumento da interação de moléculas de adesão da zona marginal a moléculas de adesão intercelular (I-CAM1) e vascular (V-CAM1) contribuindo para retenção das células B (Michalek, Moore *et al.*, 1980; Groeneveld, Erich *et al.*, 1985; Mebius e Kraal, 2005; Kesteman, Vansanten *et al.*, 2008). Sugerimos que capacidade de proliferação e de migração das células nos tecidos linfóides em resposta ao LPS justifica o aumento do número de folículos linfóides e da área dos compartimentos no baço.

A morfometria do folículo linfóide e da zona marginal mostra acréscimo maior da área dessas estruturas em animais endotoxêmicos que foram desnutridos. Isso faz suspeitar que esses animais possuam células de defesa com capacidade baixa em combater a endotoxemia precisando de um maior reforço, caracterizado aqui pelo acréscimo da área folicular e da zona marginal. O menor número e o menor tamanho de aglomerados leucocitários evidenciam modificações estruturais no baço podendo repercutir negativamente na função imune. Nossos dados, em parte, ajudam a entender a relação da desnutrição com a maior fragilidade do sistema imune e conseqüentemente ao aumento da susceptibilidade a doenças.

O fato do treinamento físico ter induzido um aumento leve no tamanho folicular e na zona marginal em resposta ao LPS indica que o treinamento favoreceu a defesa do organismo talvez por tornar essas células mais eficientes no combate a endotoxemia precisando de menos células e de seus produtos para restabelecer a homeostase; e por responder de forma menos intensa ao aumento plasmático de hormônios liberados pelo estresse agudo durante o processo infeccioso.

O treinamento físico moderado leva ativação repetida do eixo HPA, induzindo adaptação da própria resposta do eixo à situação de estresse agudo, reduzindo a sensibilidade da adrenal ao ACTH (Duclos, Gouarne *et al.*, 2003; Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). Esse fenômeno é conhecido como tolerância cruzada (Leandro, De Lima *et al.*, 2007) onde a

aplicação de forma continuada de um estímulo, representada pelo treinamento físico, induz menor amplitude das alterações orgânicas em resposta a exposição de um novo estímulo estressor, neste caso a infecção.

Nossos resultados demonstram que a desnutrição perinatal programa mudanças na morfologia do baço e que o treinamento moderado exerce efeito positivo neste contexto, induzindo acréscimo do número de folículos linfóides, revertendo assim à seqüela da programação nutricional sobre o número de folículos em animais desnutridos, e, por atenuar a amplitude da resposta a situação de infecção aguda representada pelo menor aumento da área folicular e da zona marginal em animais treinados endotoxêmicos.

## Referências

- Altamura, M., L. Caradonna, *et al.* Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. Immunopharmacol Immunotoxicol, v.23, n.2, May, p.153-61. 2001.
- Annane, D., E. Bellissant, *et al.* Septic shock. Lancet, v.365, n.9453, Jan 1-7, p.63-78. 2005.
- Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, *et al.* Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. Immunity, v.29, n.3, Sep 19, p.476-86. 2008.
- Barker, D. J. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med, v.261, n.5, May, p.412-7. 2007.
- Besedovsky, H. O., A. E. Del Rey, *et al.* Immune-neuroendocrine interactions. J Immunol, v.135, n.2 Suppl, Aug, p.750s-754s. 1985.
- Betancourt, M., R. Ortiz, *et al.* Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. Mutat Res, v.283, n.3, Nov, p.173-7. 1992.
- Bozza, P. T., H. C. Castro-Faria-Neto, *et al.* Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. Eur J Pharmacol, v.270, n.2-3, Apr 4, p.143-9. 1994.
- Cesta, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicol Pathol, v.34, n.5, p.455-65. 2006.
- Cortes-Barberena, E., H. Gonzalez-Marquez, *et al.* Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. Clin Exp Immunol, v.152, n.3, Jun, p.585-92. 2008.
- De Moura, E. G., P. C. Lisboa, *et al.* Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. J Nutr Biochem, v.18, n.2, Feb, p.134-9. 2007.

Duclos, M., C. Gouarne, *et al.* Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids. J Appl Physiol, v.94, n.3, Mar, p.869-75. 2003.

Eder, K., C. Vizler, *et al.* The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, v.389, n.1, Nov 6, p.46-51. 2009.

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

Fock, R. A., M. A. Vinolo, *et al.* Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. Cytokine, v.40, n.2, Nov, p.105-14. 2007.

Gleeson, M., B. Mcfarlin, *et al.* Exercise and Toll-like receptors. Exerc Immunol Rev, v.12, p.34-53. 2006.

Gluckman, P. D., C. Y. Seng, *et al.* Low birthweight and subsequent obesity in Japan. Lancet, v.369, n.9567, Mar 31, p.1081-2. 2007.

Groeneveld, P. H., T. Erich, *et al.* In vivo effects of LPS on B lymphocyte subpopulations. Migration of marginal zone-lymphocytes and IgD-blast formation in the mouse spleen. Immunobiology, v.170, n.5, Dec, p.402-11. 1985.

\_\_\_\_\_. The differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on splenic non-lymphoid cells demonstrated by monoclonal antibodies. Immunology, v.58, n.2, Jun, p.285-90. 1986.

Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, *et al.* Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? Clin Infect Dis, v.41 Suppl 7, Nov 15, p.S465-9. 2005.

Huang, Y. C. Malnutrition in the critically ill. Nutrition, v.17, n.3, Mar, p.263-4. 2001.

Keast, D., K. Cameron, *et al.* Exercise and the immune response. Sports Med, v.5, n.4, Apr, p.248-67. 1988.

Kesteman, N., G. Vansanten, *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. J Leukoc Biol, v.83, n.3, Mar, p.640-7. 2008.

Kim, H., M. S. Shin, *et al.* Modulation of immune responses by treadmill exercise in Sprague-Dawley rats. J Sports Med Phys Fitness, v.43, n.1, Mar, p.99-104. 2003.

Klasing, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. Poult Sci, v.77, n.8, Aug, p.1119-25. 1998.

Kwak, Y. S. Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. J Sports Sci, v.24, n.9, Sep, p.973-8. 2006.

Landgraf, M. A., L. L. Martinez, *et al.* Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. J Nutr, v.135, n.6, Jun, p.1480-5. 2005.

Landgraf, M. A., C. Tostes Rde, *et al.* Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. Nutrition, v.23, n.2, Feb, p.145-56. 2007.

Langley-Evans, S. C. e L. J. Carrington. Diet and the developing immune system. Lupus, v.15, n.11, p.746-52. 2006.

Leandro, C. G., T. M. De Lima, *et al.* Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. Neuroimmunomodulation, v.14, n.1, p.4-7. 2007.

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

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

Lopes De Souza, S., R. Orozco-Solis, *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. Eur J Neurosci, v.27, n.6, Mar, p.1400-8. 2008.

Lucas, A. Programming by early nutrition in man. Ciba Found Symp, v.156, p.38-50; discussion 50-5. 1991.

Mabbott, N. A. The complement system in prion diseases. Curr Opin Immunol, v.16, n.5, Oct, p.587-93. 2004.

Mcdade, T. W., M. A. Beck, *et al.* Prenatal undernutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function. J Nutr, v.131, n.4, Apr, p.1225-31. 2001.

Mebius, R. E. e G. Kraal. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol, v.5, n.8, Aug, p.606-16. 2005.

Medzhitov, R. e C. A. Janeway, Jr. An ancient system of host defense. Curr Opin Immunol, v.10, n.1, Feb, p.12-5. 1998.

Michalek, S. M., R. N. Moore, *et al.* The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. J Infect Dis, v.141, n.1, Jan, p.55-63. 1980.

Moore, S. E., T. J. Cole, *et al.* Prenatal or early postnatal events predict infectious deaths in young adulthood in rural Africa. Int J Epidemiol, v.28, n.6, Dec, p.1088-95. 1999.

Moore, S. E., A. C. Collinson, *et al.* Early immunological development and mortality from infectious disease in later life. Proc Nutr Soc, v.65, n.3, Aug, p.311-8. 2006.

Orozco-Solis, R., S. Lopes De Souza, *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. Physiol Behav, v.96, n.3, Mar 2, p.481-92. 2009.

Ortiz, R., L. Cortes, *et al.* Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. Br J Nutr, v.86, n.5, Nov, p.545-8. 2001.

Passos, M. C. F., C. F. Ramos, *et al.* Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring  
Nutrltton Researchpynght, v.20, n. I I, p.1603-1612. 2000.

Prentice, A. M. e S. E. Moore. Early programming of adult diseases in resource poor countries. Arch Dis Child, v.90, n.4, Apr, p.429-32. 2005.

Rivier, C., R. Chizzonite, *et al.* In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. Endocrinology, v.125, n.6, Dec, p.2800-5. 1989.

Rubhana Raqib, D. S. A., Protim Sarker, Shaikh Meshbahuddin Ahmad, Gul Ara, Mohammed Yunus, Sophie E Moore, and George Fuchs. Low birth weight is associated with altered immune function in rural Bangladeshi children: a birth cohort study. Am J Clin Nutr v.85 n.03, p.845-52. 2007.

Savino, W., M. Dardenne, *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. Br J Nutr, v.98 Suppl 1, Oct, p.S11-6. 2007.

Schreuder, M. F., J. R. Nyengaard, *et al.* Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. Am J Physiol Renal Physiol, v.291, n.5, Nov, p.F1104-7. 2006.

Silveira, L. R., J. Fiamoncini, *et al.* Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. J Cell Physiol, v.217, n.1, Oct, p.1-12. 2008.

Torres. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos a esplenectomia subtotal. Acta Cir. Bras, v.15, n.2. 2000.

Van De Poel, E., A. R. Hosseinpoor, *et al.* Socioeconomic inequality in malnutrition in developing countries. Bull World Health Organ, v.86, n.4, Apr, p.282-91. 2008.

West, L. J. Defining critical windows in the development of the human immune system. Hum Exp Toxicol, v.21, n.9-10, Sep-Oct, p.499-505. 2002.

Zandvoort, A. e W. Timens. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. Clin Exp Immunol, v.130, n.1, Oct, p.4-11. 2002.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Carmelita de Lima Cavalcanti pelo apoio técnico do material histológico.

## Tabelas

**Tabela 1:** Composição de dieta experimental isocalórica com diferentes teores de proteína.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	94,12 g	200,0 g
Mix Vitamínico**	10,0 g	10,0 g
Mix Mineral***	35,0 g	35,0 g
Celulose	50,0 g	50,0 g
Bitartarato de Colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de Soja	70,0 ml	70,0 ml
Amido de Milho	503,4g	503,4 g
Amido Dextrinizado	132,0 g	132,0 g
Sacarose	100,0 g	100,0 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

\*Quantidade para 1 kg de dieta.

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-ácido aminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

\*\* Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO<sub>4</sub>, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO<sub>4</sub>, 2000; Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 120; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 200; elementos traços, 400 (MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 98; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 20; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 80; CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40 g [per kg of diet]).

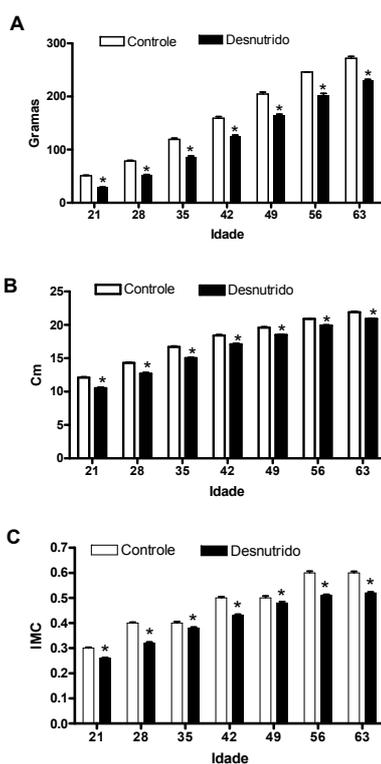
**Tabela 2:** Composição da dieta LABINA (Purina Brasil) utilizada após o desmame

Ingredientes*	Quantidade (g)	Calorias (Kcal)
Proteína	23,0	92,0
Carboidratos	74,5	288,0
Gordura	2,5	22,5
Total	100,0	402,5

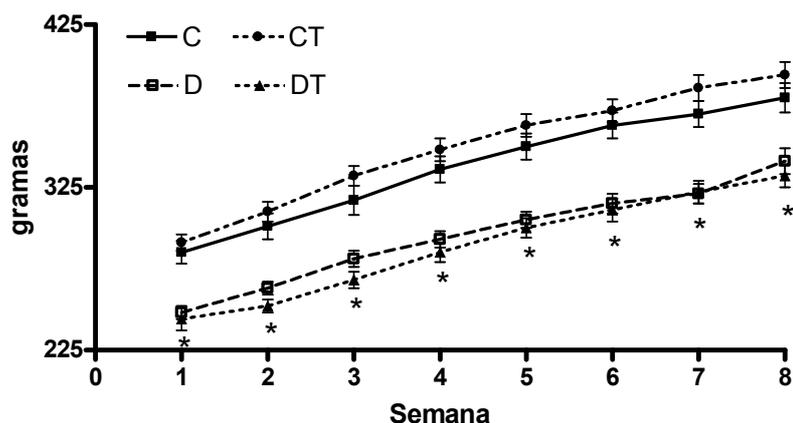
\*Composição básica: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato de bicálcico, sal, pré-mix.

Fonte: Purina Brasil.

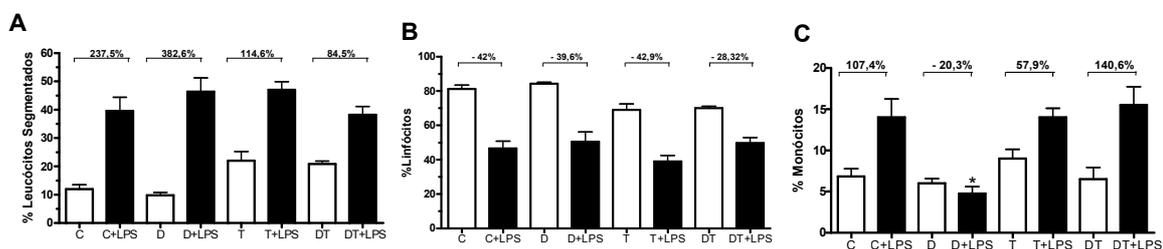
## Figuras e Legendas



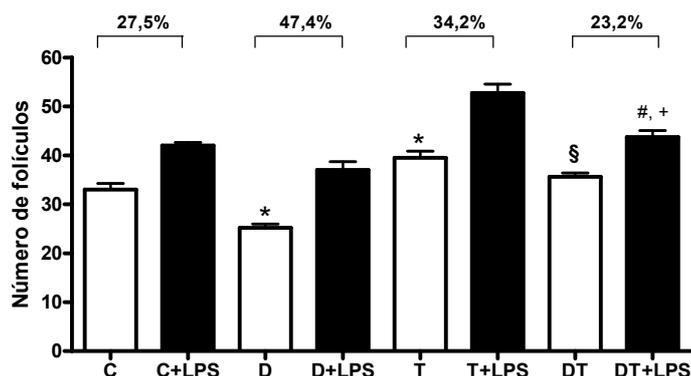
**Figura 1** - Efeito da desnutrição perinatal no peso corporal (A), no comprimento naso-anal (B) e no IMC (C) dos ratos entre 21 a 63 dias de vida, controle n=34 e desnutrido n=47. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. ANOVA two-way, seguido do teste de Bonferroni, \* p < 0,05.



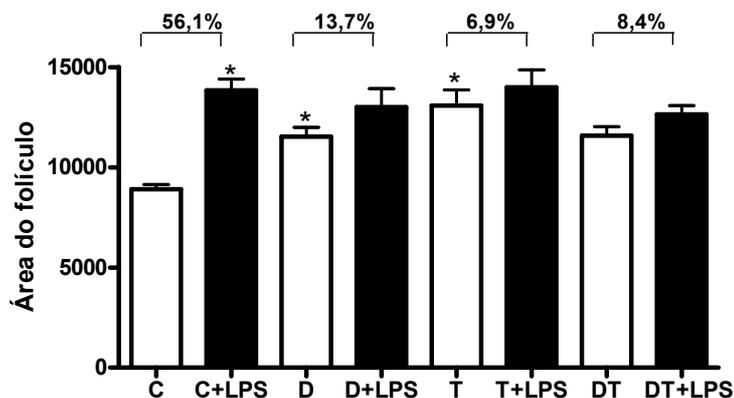
**Figura 2** - Efeito da desnutrição perinatal no peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 8 semanas de treinamento físico moderado. Grupos: controle (C, n=16), desnutrido (D, n=16), treinado (T, n= 12) e desnutrido treinado (DT, n=14). Os valores são expressos em média ± EPM. ANOVA two-way, seguido do teste de Bonferroni, \* p < 0,05.



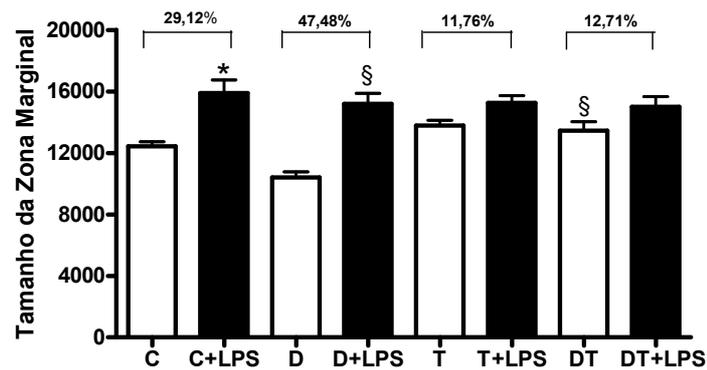
**Figura 3** – Efeitos da desnutrição precoce e do treinamento físico moderado sobre a contagem diferencial de leucócitos do sangue de ratos adultos endotoxêmicos. Grupos: Controle (C), Controle endotoxêmico (C+LPS), Desnutrido (D), Desnutrido endotoxêmico (D+LPS), Controle Treinado (T), Controle Treinado endotoxêmico (T+LPS), Desnutrido Treinado (DT), Desnutrido Treinado Endotoxêmico (DT+LPS), n=6 em cada grupo. Acima das barras encontra-se o percentual de aumento do número células após a estimulação com LPS. Os valores estão expressos em média ± EPM. ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey, \* p < 0,05.



**Figura 4** – Efeitos da desnutrição precoce e do treinamento físico moderado sobre o número de folículos linfóides do baço de ratos adultos endotoxêmicos. Grupos: Controle (C), Controle endotoxêmico (C+LPS), Desnutrido (D), Desnutrido endotoxêmico (D+LPS), Treinado (T), Treinado endotoxêmico (T+LPS), Desnutrido Treinado (DT), Desnutrido Treinado Endotoxêmico (DT+LPS), n=6 em cada grupo. Acima das barras encontra-se o percentual de aumento do número de folículos linfóides em resposta ao LPS. Os valores estão expressos em média ± EPM. ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey,  $p < 0,05$ . \*versus grupo C, § versus grupo D, # versus grupo D+LPS e + versus grupo DT.



**Figura 5** – Efeitos da desnutrição precoce e do treinamento físico moderado sobre a área folicular do baço de ratos adultos endotoxêmicos. Grupos: Controle (C), Controle endotoxêmico (C+LPS), Desnutrido (D), Desnutrido endotoxêmico (D+LPS), Controle Treinado (T), Controle Treinado endotoxêmico (T+LPS), Desnutrido Treinado (DT), Desnutrido Treinado Endotoxêmico (DT+LPS), n=6 em cada grupo. A morfometria foi calculada em pixel. Acima das barras encontra-se o percentual de aumento da área folicular em resposta ao LPS. Os valores estão expressos em média ± EPM. ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey, \*  $p < 0,05$  versus grupo C.



**Figura 6** – Efeitos da desnutrição precoce e do treinamento físico moderado sobre a espessura da zona marginal do baço de ratos adultos endotoxêmicos. Grupos: Controle (C), Controle endotoxêmico (C+LPS), Desnutrido (D), Desnutrido endotoxêmico (D+LPS), Controle Treinado (T), Controle Treinado endotoxêmico (T+LPS), Desnutrido Treinado (DT), Desnutrido Treinado Endotoxêmico (DT+LPS), n=6 em cada grupo. Acima das barras encontra-se o percentual de aumento da o número da zona marginal em resposta ao LPS. Os valores estão expressos em média ± EPM. ANOVA one-way, seguido do teste de Tukey, \*  $p < 0,05$  versus grupo C e §  $p < 0,05$  versus grupo D.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desnutrição durante a gestação e lactação prejudicou o crescimento somático dos animais. Também comprometeu características histológicas do baço, induzindo redução do tamanho da zona marginal, redução do número de folículo linfóide e ao contrario do esperado induziu alargamento folicular. Acredita-se que o comprometimento desses aglomerados leucocitários possa significar em déficit da reserva de leucócitos, repercutindo negativamente na competência da imunidade inata e adaptativa, aumentando a suscetibilidade a doenças.

É possível ainda que a desnutrição perinatal possa ter afetado a função leucocitária no baço. Esta questão é interessante, contudo não avaliada por esse trabalho, ficando para ser estudada em nossas pesquisas futuras. O comprometimento da função leucocitária provocada pela desnutrição no início da vida foi mostrado em pesquisas recentes no pulmão e no sangue. Nossos resultados apontam para o efeito “programador” da desnutrição precoce alterando a morfologia do baço.

O grupo desnutrido apresentou sinais de menor eficiência de combate a endotoxemia, respondendo, por exemplo, com o maior percentual de aumento do número de folículos linfóides. Este efeito não ocorreu no grupo desnutrido treinado em resposta ao LPS, o que pode ser atribuído ao efeito imunoestimulador do treinamento físico moderado melhorando os mecanismos da imunidade e compensando o déficit no número de folículos linfóides do baço, provocado pela desnutrição. O treinamento físico moderado parece exercer papel protetor para o organismo reduzindo a amplitude da resposta imune aguda ao estímulo endotoxêmico, verificado pela resposta do tamanho folicular e da zona marginal.

## **REFERÊNCIAS**

---

**REFERÊNCIAS** (Norma adotada: ABNT/NBR6023)

- Altamura, M., L. Caradonna, *et al.* Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. Immunopharmacol Immunotoxicol, v.23, n.2, May, p.153-61. 2001.
- Annane, D., E. Bellissant, *et al.* Septic shock. Lancet, v.365, n.9453, Jan 1-7, p.63-78. 2005.
- Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, *et al.* Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. Immunity, v.29, n.3, Sep 19, p.476-86. 2008.
- Bacurau, R. F., M. A. Belmonte, *et al.* Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumor-bearing rats. Cell Biochem Funct, v.18, p.249-258. 2000.
- \_\_\_\_\_. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. Cell Biochem Funct, v.18, n.4, Dec, p.249-58. 2000.
- Barker, D. J. The origins of the developmental origins theory. J Intern Med, v.261, n.5, May, p.412-7. 2007.
- Barker, D. J. e C. Osmond. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet, v.1, n.8489, May 10, p.1077-81. 1986.
- Barker, D. J., C. Osmond, *et al.* Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. Bmj, v.298, n.6673, Mar 4, p.564-7. 1989.
- Besedovsky, H. O., A. E. Del Rey, *et al.* Immune-neuroendocrine interactions. J Immunol, v.135, n.2 Suppl, Aug, p.750s-754s. 1985.
- Betancourt, M., R. Ortiz, *et al.* Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. Mutat Res, v.283, n.3, Nov, p.173-7. 1992.
- Bozza, P. T., H. C. Castro-Faria-Neto, *et al.* Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. Eur J Pharmacol, v.270, n.2-3, Apr 4, p.143-9. 1994.
- Carlson, E. S., J. D. Stead, *et al.* Perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. Hippocampus, v.17, n.8, p.679-91. 2007.
- Castro-Faria-Neto, H. C., C. M. Penido, *et al.* A role for lymphocytes and cytokines on the eosinophil migration induced by LPS. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.92 Suppl 2, p.197-200. 1997.
- Cesta, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. Toxicol Pathol, v.34, n.5, p.455-65. 2006.
- Chakravarty, S., S. Godbole, *et al.* Systematic analysis of the effect of multiple templates on the accuracy of comparative models of protein structure. BMC Struct Biol, v.8, p.31. 2008.
- Chandra, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. Am J Clin Nutr, v.66, n.2, Aug, p.460S-463S. 1997.

- Chukwuma, C., Sr. e J. Tuomilehto. The 'thrifty' hypotheses: clinical and epidemiological significance for non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors. J Cardiovasc Risk, v.5, n.1, Feb, p.11-23. 1998.
- Cortes-Barberena, E., H. Gonzalez-Marquez, *et al.* Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. Clin Exp Immunol, v.152, n.3, Jun, p.585-92. 2008.
- De Moura, E. G., P. C. Lisboa, *et al.* Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. J Nutr Biochem, v.18, n.2, Feb, p.134-9. 2007.
- De Smedt, T., B. Pajak, *et al.* Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J Exp Med, v.184, n.4, Oct 1, p.1413-24. 1996.
- Dobbing, J. e J. Sands. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. Arch Fr Pediatr, v.42, n.3, Mar, p.199-203. 1985.
- Dos Santos Cunha, W. D., M. V. Giampietro, *et al.* Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. Med Sci Sports Exerc, v.36, n.12, Dec, p.2059-64. 2004.
- Drela, N., E. Kozdron, *et al.* Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. BMC Geriatr, v.4, Sep 29, p.8. 2004.
- Duclos, M., C. Gouarne, *et al.* Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids. J Appl Physiol, v.94, n.3, Mar, p.869-75. 2003.
- Eder, K., C. Vizler, *et al.* The role of lipopolysaccharide moieties in macrophage response to *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, v.389, n.1, Nov 6, p.46-51. 2009.
- Ferreira-E-Silva, W. T. Aspectos da resposta inflamatória em ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição no período de aleitamento. (Mestrado). Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002. 61 p.
- Ferreira E Silva, W. T. Aspectos da resposta inflamatória em ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição no período de aleitamento. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição. Recife. 2002
- Ferreira, E. S. W. T., B. A. Galvao, *et al.* Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. Neuroimmunomodulation, v.16, n.4, p.219-27. 2009.
- Ferry, A., P. Rieu, *et al.* Effect of physical exhaustion and glucocorticoids (dexamethasone) on T-cells of trained rats. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, v.66, n.5, p.455-60. 1993.
- Fock, R. A., M. A. Vinolo, *et al.* Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. Cytokine, v.40, n.2, Nov, p.105-14. 2007.
- Friman, G. e N. G. Ilback. Acute infection: metabolic responses, effects on performance, interaction with exercise, and myocarditis. Int J Sports Med, v.19 Suppl 3, Jul, p.S172-82. 1998.

Giugliano, G., G. Brevetti, *et al.* The prognostic impact of general and abdominal obesity in peripheral arterial disease. Int J Obes (Lond), Nov 24. 2009.

Gleeson, M., B. Mcfarlin, *et al.* Exercise and Toll-like receptors. Exerc Immunol Rev, v.12, p.34-53. 2006.

Gluckman, P. D., C. Y. Seng, *et al.* Low birthweight and subsequent obesity in Japan. Lancet, v.369, n.9567, Mar 31, p.1081-2. 2007.

Gniuli, D., A. Calcagno, *et al.* Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. J Lipid Res, v.49, n.9, Sep, p.1936-45. 2008.

Groeneveld, P. H., T. Erich, *et al.* In vivo effects of LPS on B lymphocyte subpopulations. Migration of marginal zone-lymphocytes and IgD-blast formation in the mouse spleen. Immunobiology, v.170, n.5, Dec, p.402-11. 1985.

\_\_\_\_\_. The differential effects of bacterial lipopolysaccharide (LPS) on splenic non-lymphoid cells demonstrated by monoclonal antibodies. Immunology, v.58, n.2, Jun, p.285-90. 1986.

Groeneveld, P. H. e N. Van Rooijen. In vivo effects of lipopolysaccharide on lymphoid and non-lymphoid cells in the mouse spleen. Reduction of T-lymphocytes and phagocytosis in the inner parts of the periarteriolar lymphocyte sheath. Cell Tissue Res, v.236, n.3, p.637-42. 1984.

Hales, C. N. e D. J. Barker. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia, v.35, n.7, Jul, p.595-601. 1992.

Hata, T., A. Kuno, *et al.* Three-dimensional sonographic volume measurement of the fetal lung. J Obstet Gynaecol Res, v.33, n.6, Dec, p.793-8. 2007.

Hodyl, N. A., F. R. Walker, *et al.* Modelling prenatal bacterial infection: functional consequences of altered hypothalamic pituitary adrenal axis development. Behav Brain Res, v.178, n.1, Mar 12, p.108-14. 2007.

Hosea, H. J., E. S. Rector, *et al.* Dietary repletion can replenish reduced T cell subset numbers and lymphoid organ weight in zinc-deficient and energy-restricted rats. Br J Nutr, v.91, n.5, May, p.741-7. 2004.

Hotchkiss, R. S., C. M. Coopersmith, *et al.* Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? Clin Infect Dis, v.41 Suppl 7, Nov 15, p.S465-9. 2005.

Huang, Y. C. Malnutrition in the critically ill. Nutrition, v.17, n.3, Mar, p.263-4. 2001.

I.O.M. (Institute of Medicine). Dietary Reference Intakes for Energy, carbohydrates. Fiber, fat, protein and acids (macronutrients). 2002.

Keast, D., K. Cameron, *et al.* Exercise and the immune response. Sports Med, v.5, n.4, Apr, p.248-67. 1988.

Kesteman, N., G. Vansanten, *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. J Leukoc Biol, v.83, n.3, Mar, p.640-7. 2008.

- Kim, H., M. S. Shin, *et al.* Modulation of immune responses by treadmill exercise in Sprague-Dawley rats. J Sports Med Phys Fitness, v.43, n.1, Mar, p.99-104. 2003.
- Kizaki, T., T. Takemasa, *et al.* Adaptation of macrophages to exercise training improves innate immunity. Biochem Biophys Res Commun, v.372, n.1, Jul 18, p.152-6. 2008.
- Klasing, K. C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. Poult Sci, v.77, n.8, Aug, p.1119-25. 1998.
- Kwak, Y. S. Effects of training on spleen and peritoneal exudate reactive oxygen species and lymphocyte proliferation by splenocytes at rest and after an acute bout of exercise. J Sports Sci, v.24, n.9, Sep, p.973-8. 2006.
- Lana, A. C., C. A. Paulino, *et al.* Influência dos exercício físicos de baixo e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. Rev Bras Med Esporte, v.12, n.5. 2006.
- Landgraf, M. A., L. L. Martinez, *et al.* Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. J Nutr, v.135, n.6, Jun, p.1480-5. 2005.
- Landgraf, M. A., C. Tostes Rde, *et al.* Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. Nutrition, v.23, n.2, Feb, p.145-56. 2007.
- Langley-Evans, S. C. e L. J. Carrington. Diet and the developing immune system. Lupus, v.15, n.11, p.746-52. 2006.
- Law, C. M. Fetal and infant influences on non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). Diabet Med, v.13, n.9 Suppl 6, Sep, p.S49-52. 1996.
- Leandro, C. G., T. M. De Lima, *et al.* Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. Neuroimmunomodulation, v.14, n.1, p.4-7. 2007.
- Leandro, C. G., A. C. Levada, *et al.* A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. J Strength Cond Res, v.21, n.3, Aug, p.751-6. 2007.
- Leandro, C. G., R. Manhaes De Castro, *et al.* Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico  
Rev Bras Med Esporte v.Vol. 13, n.5. 2007.
- Leandro, C. G., T. Martins De Lima, *et al.* Physical training attenuates the stress-induced changes in rat T-lymphocyte function. Neuroimmunomodulation, v.13, n.2, p.105-13. 2006.
- Levada-Pires, A. C., R. H. Lambertucci, *et al.* Exercise training raises expression of the cytosolic components of NADPH oxidase in rat neutrophils. Eur J Appl Physiol, v.100, n.2, May, p.153-60. 2007.
- Lopes De Souza, S., R. Orozco-Solis, *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. Eur J Neurosci, v.27, n.6, Mar, p.1400-8. 2008.
- Lucas, A. Programming by early nutrition in man. Ciba Found Symp, v.156, p.38-50; discussion 50-5. 1991.

- Mabbott, N. A. The complement system in prion diseases. Curr Opin Immunol, v.16, n.5, Oct, p.587-93. 2004.
- Mcdade, T. W., M. A. Beck, *et al.* Prenatal undernutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function. J Nutr, v.131, n.4, Apr, p.1225-31. 2001.
- Mebius, R. E. e G. Kraal. Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol, v.5, n.8, Aug, p.606-16. 2005.
- Medzhitov, R. e C. A. Janeway, Jr. An ancient system of host defense. Curr Opin Immunol, v.10, n.1, Feb, p.12-5. 1998.
- Michalek, S. M., R. N. Moore, *et al.* The primary role of lymphoreticular cells in the mediation of host responses to bacterial endotoxin. J Infect Dis, v.141, n.1, Jan, p.55-63. 1980.
- Moore, S. E., T. J. Cole, *et al.* Prenatal or early postnatal events predict infectious deaths in young adulthood in rural Africa. Int J Epidemiol, v.28, n.6, Dec, p.1088-95. 1999.
- Moore, S. E., A. C. Collinson, *et al.* Early immunological development and mortality from infectious disease in later life. Proc Nutr Soc, v.65, n.3, Aug, p.311-8. 2006.
- Nascimento, E., T. Cavalcante, *et al.* O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados Rev Port Cien Desp., v.4, n.3, p.26-33. 2004.
- Neiman, J., H. M. Haapaniemi, *et al.* Neurological complications of drug abuse: pathophysiological mechanisms. Eur J Neurol, v.7, n.6, Nov, p.595-606. 2000.
- Newton, R. U. e D. A. Galvao. Exercise in Prevention and Management of Cancer. Curr Treat Options Oncol, Aug 13. 2008.
- Nieman, D. C., S. L. Nehlsen-Cannarella, *et al.* The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. Int J Sports Med, v.11, n.6, Dec, p.467-73. 1990.
- Orozco-Solis, R., S. Lopes De Souza, *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. Physiol Behav, v.96, n.3, Mar 2, p.481-92. 2009.
- Ortiz, R., L. Cortes, *et al.* Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. Br J Nutr, v.86, n.5, Nov, p.545-8. 2001.
- Passos, M. C. F., C. F. Ramos, *et al.* Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring Nutrition Research, v.20, n. 11, p.1603-1612. 2000.
- Pedersen, B. K. e L. Hoffman-Goetz. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. Physiol Rev, v.80, n.3, Jul, p.1055-81. 2000.
- Prentice, A. M. e S. E. Moore. Early programming of adult diseases in resource poor countries. Arch Dis Child, v.90, n.4, Apr, p.429-32. 2005.
- Queiros-Santos, A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos., Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

- \_\_\_\_\_. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição. Recife. 2000
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, v.123, n.11, Nov, p.1939-51. 1993.
- Rivier, C., R. Chizzonite, *et al.* In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. Endocrinology, v.125, n.6, Dec, p.2800-5. 1989.
- Rosa, L. F. P. B. C. e M. W. Vaisberg. Influências do exercício na resposta imune. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, v.8, n.4. 2002.
- Rubhana Raqib, D. S. A., Protim Sarker, Shaikh Meshbahuddin Ahmad, Gul Ara, Mohammed Yunus, Sophie E Moore, and George Fuchs. Low birth weight is associated with altered immune function in rural Bangladeshi children: a birth cohort study. Am J Clin Nutr v.85 n.03, p.845-52. 2007.
- Savino, W., M. Dardenne, *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. Br J Nutr, v.98 Suppl 1, Oct, p.S11-6. 2007.
- Schreuder, M. F., J. R. Nyengaard, *et al.* Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. Am J Physiol Renal Physiol, v.291, n.5, Nov, p.F1104-7. 2006.
- Schulenburg, H., C. L. Kurz, *et al.* Evolution of the innate immune system: the worm perspective. Immunol Rev, v.198, Apr, p.36-58. 2004.
- Schuler, S. L., J. Gurmini, *et al.* Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. JPEN J Parenter Enteral Nutr, v.32, n.2, Mar-Apr, p.184-9. 2008.
- Shephard, R. J. e P. N. Shek. Potential impact of physical activity and sport on the immune system--a brief review. Br J Sports Med, v.28, n.4, Dec, p.247-55. 1994.
- Silva, H. J. D., S. M. O. C. Marinho, *et al.* Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats International Journal of Morphology v.v.23, n.n.3, p.227-230. 2005.
- Silveira, L. e B. Denadai. Efeito modulatório de diferentes intensidades de esforço sobre a via glicolítica durante o exercício contínuo e intermitente. Revista Paulista Educação Física, v.16, n.2, p.186-197. 2003.
- Silveira, L. R., J. Fiamoncini, *et al.* Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. J Cell Physiol, v.217, n.1, Oct, p.1-12. 2008.
- Smart, J. L. Undernutrition during early life and its effects on animal development and behaviour. Neropharmacology, v.20, n.12b, p.1251-1252. 1981.
- Spencer, S. J., S. Martin, *et al.* Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. Neuropsychopharmacology, v.31, n.9, Sep, p.1910-8. 2006.

Timmons, B. W., M. A. Tarnopolsky, *et al.* Sex-based effects on the distribution of NK cell subsets in response to exercise and carbohydrate intake in adolescents. J Appl Physiol, v.100, n.5, May, p.1513-9. 2006.

Torres. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos a esplenectomia subtotal. Acta Cir. Bras, v.15, n.2. 2000.

Van De Poel, E., A. R. Hosseinpoor, *et al.* Socioeconomic inequality in malnutrition in developing countries. Bull World Health Organ, v.86, n.4, Apr, p.282-91. 2008.

Van Ewijk, W. e P. Nieuwenhuis. Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. Experientia, v.41, n.2, Feb 15, p.199-208. 1985.

Veiga, R. K. A., M. R. Melo-Júnior, *et al.* Alterações morfométricas no timo, baço e placas depeyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. Revista Eletrônica de Farmacia, v.4, n.1, p.32-42. 2007.

West, L. J. Defining critical windows in the development of the human immune system. Hum Exp Toxicol, v.21, n.9-10, Sep-Oct, p.499-505. 2002.

Zandvoort, A. e W. Timens. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. Clin Exp Immunol, v.130, n.1, Oct, p.4-11. 2002.





**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências Biológicas**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
 fax: (55 81) 2126 8350  
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 13 de fevereiro de 2009

Ofício nº 110/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
 Para: **Profª. Carol Virginia Góis Leandro**  
 Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória  
 Processo nº 23076.000904 / 2009 – 01

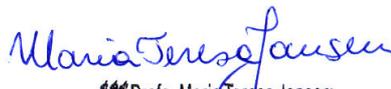
Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado *“Efeito do treinamento físico moderado sobre os leucócitos sanguíneos, medulares e esplênicos em ratos adultos desnutridos durante a gestação e lactação.”*

Concluimos 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 CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

*Maria Teresa Jansen*  
  
 Prof. Maria Teresa Jansen  
 Presidente do CEEA  


Observação:  
 Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;  
 Animal; Ratos Wistar; Machos e Fêmeas; Idade: Adultos e  
 filhotes do 1º ao 21º dia; Número de animais previsto no  
 protocolo: 42 animais.



# Experimental Physiology

Translation and Integration

## INFORMATION AND GUIDANCE FOR AUTHORS

### ANNOUNCEMENTS

- [\*Open access, funding bodies and Experimental Physiology\*](#)
- [\*Publication costs\*](#)

Last updated: 17 November 2009

### Journal policies

- [Ethical standards in research](#)
  - [Animal experiments](#)
  - [Human experiments](#)
- [Editorial policy](#)
  - Confidentiality
  - Conflict of interest
  - Unique reagents
- [Publication ethics](#)
  - Overlapping material, plagiarism and duplicate publication
  - Simultaneous submission and the exclusive licence to publish
  - Image manipulation
- [Publication costs](#)
- Open access charges
- Colour charges
- Offprint charges

### Guidelines for manuscript preparation

- [Journal style and conventions](#)
  - [Spelling and style](#)
  - [Symbols, units and mathematical notation](#)
  - [Abbreviations](#)
  - [Chemical and biological nomenclature](#)
- [Supplemental material](#)
- [Links to websites](#)
- [Use of previously published material](#)

### Research papers

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Introduction](#)
- [References](#)
- [Acknowledgements](#)

- [Tables](#)
- [Figures and legends](#)

### **Submit a manuscript**

### **The review process**

### **What happens following acceptance**

[\[Back to top\]](#)

## **ABOUT EXPERIMENTAL PHYSIOLOGY**

[Scope and subject areas](#)

[Journal statistics](#)

[Editorial Board](#)

[Contact the Publications Office](#)

### **Scope and subject areas**

**Experimental Physiology** publishes Research Papers which report the results of original research in most areas of physiology (see table below). These are normally limited to 6,000 words including legends and references. Papers should embrace the journal's orientation of translation and integration. Specifically, we are keen to receive manuscripts that deal with both physiological and pathophysiological questions that investigate gene/protein function using molecular, cellular and whole animal approaches. In addition pertinent methodological papers are encouraged as are manuscripts that use computational models to further our understanding of physiological processes.

When submitting a manuscript authors should specify one of the subject areas below and appropriate Editor(s).

	<b>Subject area</b>	<b>Relevant Editor(s)</b>
1	Autonomic neuroscience	M. Chappleau, S. Kasparov, J. Osborn, J. F. R. Paton,
2	Cardiovascular control	G. Billman, W Giles, M Kaufman, J. Osborn,
3	Computational physiology	A McCulloch, N. Smith
4	Genomic physiology	M. Raizada, X Yu
5	GI and epithelial physiology	P. Fong, N. Simmons
6	Heart/cardiac muscle	W. Giles, D Paterson, G. L. Smith, X Yu
7	Human/environmental and exercise physiology	D. Green, M Kaufman, P. Raven, M. White
8	Muscle physiology	K. Baldwin, S. Harridge, M. Hogan, S. Wray
9	Neuroendocrinology/endocrinology	D. Murphy
10	Renal physiology	N. Simmons
11	Respiratory physiology	N. Prabhakar, G Semenza
12	Vascular physiology	S. Egginton, D. Green, S. Wray

Further details of Editor's expertise can be found at <http://ep.physoc.org/misc/whicheedita.pdf> . Authors are also encouraged to supply the names of up to three referees.

The journal also publishes invited reviews dealing with rapidly developing areas of physiology or which update understanding of classical fields of physiology. Articles solicited by the Editorial Board include:

1. Hot Topic Reviews which provide an accessible synthesis of current information in topical areas of physiology. These are normally limited to 3000 words.
2. Review Articles which discuss, critically and concisely, current developments of interest to physiologists. These are normally limited to about 20 printed pages.
3. Symposium Reports which report concisely presentations given as part of symposia at scientific meetings.
4. Exchange of Views which present two opposing opinions on a topical subject published with commentary and responses from each participating author.
5. Viewpoints which discuss a selected article within the issue.
6. Lectures in which the author reports their invited lecture.
7. Themed Issue papers which can take the form of any of the above paper types focusing on the specified 'Theme'.

### **Journal statistics**

#### **ISI Web of Knowledge 2007 JCR report**

Two-year Impact Factor	2.910
Five-year Impact Factor	2.845
Cited half-life	5.4
Eigenfactor Article Influence score *	0.969

\* <http://www.eigenfactor.org/whyEigenfactor.htm>

### **Editorial statistics**

Acceptance rate (updated in January 2009)	26%
Time to first report (updated in January 2009)	4.1 weeks
Receipt to publication	4.6 months

[Editorial Board](#)

[Contact the Publications Office](#)

[\[Back to top\]](#)

## **GUIDELINES FOR MANUSCRIPT PREPARATION**

- Journal style
  - Spelling conventions
  - Symbols, units and mathematical nomenclature
  - Abbreviations
  - Chemical and biological notation

- Supplemental material
- Use of previously published material

### **Research papers**

The usual format for research papers is:

1. Title page
2. Abstract
3. Introduction
4. Methods
5. Results
6. Discussion
7. References
8. Acknowledgements
9. Tables
10. Figures and legends

Papers deviating from the usual format can be considered for publication if there are obvious and compelling reasons for the variation. Footnotes are not acceptable

#### ***Title page***

**Title.** The title of the paper should be as informative and interesting as possible, but authors may be asked to reduce the length if over 150 characters and spaces. The Editors will not accept a series of papers with the same main title, e.g. Studies in . . . Part I, Studies in . . . Part II. For abbreviations and symbols that are acceptable in the title see List 1.

**Authors.** The author submitting a manuscript must ensure that all authors listed are eligible for authorship. The Editorial Board endorses the general principles set out in Guidelines on Good Publication Practice produced by the Committee on Publication Ethics (COPE). The author submitting a manuscript must ensure that all authors listed are eligible for authorship. Each author should take responsibility for a particular section of the study and have contributed to writing the paper. Acquisition of funding or the collection of data does not alone justify authorship; these contributions to the study should be listed in the Acknowledgements.

**Addresses.** Authors should provide the minimum address information consistent with clarity and should ensure that author affiliations are clearly indicated.

**Additional information.** The following information is also required on the title page:

- a running title not exceeding 70 characters and spaces for page headings;
- three key words for use in the reviewing process
- the total number of words in the paper, excluding references and figure legends
- the name and postal and email addresses for the corresponding author
- the Subject Area as assigned in the online submission form (<http://submit.expphysiol.org>) for the print and online Table of Contents.

#### ***Abstract***

Each research paper must start with an Abstract not exceeding 5% of the length of the paper.

It should consist of a single paragraph, not numbered subsections; text for the Abstract will appear in bold. References may not be cited. Since the Abstract may be used by abstracting journals, a limit of 250 words is recommended. It must not exceed 5% of the text (excluding references and figure legends), with an absolute maximum of one printed page.

### ***Introduction***

The Introduction should make the background and the object of the research clear, indicate the justification for the work and be understandable to the non-specialist. Reference to the authors' previous work is desirable only if it has a direct bearing on the subject of the paper; an extensive historical review is not appropriate.

### ***Methods***

Methods are described once only and do not appear in the legends to figures and tables. Details should be sufficient to allow the work to be repeated by others. Authors should note that to be acceptable for publication, experiments on living vertebrates or **Octopus vulgaris** should conform with the principles of UK legislation.

**Ethical information.** Start the Methods section with a paragraph headed Ethical approval. This paragraph must contain the following information:

1. The name of the national or local ethics committee that approved the project and the relevant regulations governing all the studies described in the paper.
2. If experiments were conducted on humans, confirmation that informed consent was obtained, preferably in writing, that the studies conformed to the standards set by the latest revision of the **Declaration of Helsinki**, and that the procedures were approved by a properly constituted ethics committee, which should be named.

When describing experimental protocols the following information must be provided:

1. The numbers of animals studied.
2. In accord with the earlier section 'Ethical standards', all details concerning anaesthesia, including:
  - a. Generic name of the agents, with dose and route of administration.
  - b. Route and frequency of any supplemental doses.
  - c. When neuromuscular blocking agents are used, the criteria used for giving supplemental doses. The Results section should give a summary of these doses.
3. Where relevant, the method of humane killing at the end of the experiment.
4. In studies of isolated tissues, including cell cultures, details of the methods by which these tissues were obtained, including the method of anaesthesia or killing.

**Ethical information must be included for each manuscript. It is not sufficient to refer to previous publications for details, unless the paper is one of a series published in the same issue.** Where appropriate, lists of solutions, chemicals and equipment, and an explanation of data handling procedures may be given as separate headed paragraphs. The maker's name should be given for all non-standard chemicals, apparatus and equipment. Materials known by a trade name, e.g. Perspex, have the initial letter as a capital. The Latin names as well as the common name of non-mammalian species should be given.

### ***Results***

Quantitative observations are often better presented graphically than in tables. Authors should

ensure that their data are treated correctly, taking statistical advice if necessary. Analysis of variance (ANOVA), not **t** tests, should be used for multiple comparisons; parametric and non-parametric statistics should be used appropriately, and particular care should be taken over the expression of means and errors where data have been transformed onto a logarithmic scale. Standard deviations and standard errors of the means (as appropriate) should be given with not more than two significant figures; the form used, and the **n** value, should be stated. Tests of significance should be specified in full, e.g. Student's paired **t** test. It is not usually necessary to present the individual results of a large number of repeated tests if the number of measurements is stated. Theory and inference must be clearly distinguished from what was observed, and should not be elaborated upon in this section.

### ***Discussion***

The Discussion, which follows the Results section, should be separate from it. The assumptions involved in making inferences from the experimental results should be stated. The Discussion should not merely recapitulate the results. Authors should provide a succinct conclusion to their work and are encouraged to conclude the Discussion by expressing an opinion on the relevance of the results in the context of work cited in the paper.

In appropriate circumstances an Appendix or a Theory section may be accepted where, for example, it is necessary to derive mathematical results required in the paper.

### ***References***

The paper should conclude with a list of the papers and books cited in the text. Authors should avoid an excessive number of references. Normally about 50 should be adequate. The order of references is strictly alphabetical, regardless of chronology. The format for references to papers and books, and to chapters in books, is as follows:

Allen DG, Lannergren J & Westerblad H (1995). Muscle cell function during prolonged activity: cellular mechanisms of fatigue. **Exp Physiol**80, 497–527.

Adrian ED (1932). **The Mechanism of Nervous Action**. Humphrey Milford, London.

Buchan AMJ, Bryant MG, Polak JM, Gregor M, Ghatei MA & Bloom SR (1981). Development of regulatory peptides in the human fetal intestine. In **Gut Hormones**, 2nd edn, ed. Bloom SR & Polak JM, pp. 119–124. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Attention to punctuation is required.

Use only established abbreviated journal titles. See [PubMed journals database](#).

To download the current references style for use with EndNote, Reference Manager, ProCite, BibTeX and RefWorks go to <http://jp.physoc.org/citmgr?gca=jphysiol;579/2/289>

**DOIs for articles in press.** Many journals now publish articles online ahead of print. This initial posting to the web qualifies as publication and the citation of such articles should include the DOI (digital object identifier) if the article's full publication details have not yet been assigned:

Burnley M, Roberts CL, Thatcher R, Doust JH & Jones AM (2006). Influence of blood donation on O<sub>2</sub> uptake on-kinetics, peak O<sub>2</sub> uptake and time to exhaustion during severe-intensity cycle exercise in humans. **Exp Physiol**; DOI: 10.1113/expphysiol.2005.032805.

In the text, references should be made by giving the author and the year of publication in parentheses, e.g. (Coote, 1999), except when the author's name is part of the sentence, e.g. Coote (1999) showed that . . . . Where several references are given together they are in chronological order, separated by semicolons.

When a paper written by two authors is cited, both names are given; for three or more authors only the first name is given, followed by **et al.** Unpublished material may be referred to sparingly in the text, by giving the authors' initials and names followed by **unpublished observations** or **personal communication**; such citations should not appear in the list of references. References cited as being **in press** must have been accepted for publication, and the name of the journal or publisher included in the reference list.

### ***Acknowledgements***

Acknowledgements should be the minimum consistent with courtesy. The wording of acknowledgements of scientific assistance or advice must have been seen and approved by the persons concerned. Authors must indicate the source of their funding.

### ***Tables***

Tables should be used sparingly. They should be referred to in the text by arabic numerals, e.g. Table 3. Each table should have its own self-explanatory title. The same information should not be presented in both tabular and graphical forms. Tables will be processed as text and therefore should NOT be submitted as figures. [Guidelines for preparing figures](#).

### ***Figures and legends***

Each figure should be given a number and a title and be accompanied by a legend that makes it comprehensible without reference to the text, although undue repetition should be avoided. For detailed instructions for preparation of figures see [Guidelines for preparing figures](#).

Authors may submit coloured illustrations whenever they enhance the scientific value of the paper. Colour figures online only are free, but there is a charge for printing figures in colour. Upon submission of a manuscript, authors should download the [Colour Agreement Form](#), which gives information on the cost of colour reproduction. Authors wishing to have figures in colour online but black and white in print must submit both colour and black and white versions of the figures **for review**. They must also ensure that the figure legends apply to both versions of the figures, i.e. contain no mention of colour. Upon acceptance, only the colour versions of figures that are to be colour online only should be included with the manuscript going to press. Enquiries should be addressed to the Publications Office ([journals@physoc.org](mailto:journals@physoc.org)).

Where figures from previous publications are used (even if these have been redrawn), see [Use of previously published material](#).

Authors are encouraged to provide a figure for possible use on the cover although there is no guarantee that it will be selected. It need not necessarily appear in the paper but should be related to it. The figure must not have appeared or been submitted elsewhere.

---

## SUBMIT A MANUSCRIPT

All manuscripts must be submitted electronically using the online submission form (<http://submit.expphysiol.org>). Full instructions are given with the form. To avoid excessively large files, which are time consuming for both uploading by the authors and downloading for the reviewing process, no file should be larger than 3–4 MB.

A submission must be accompanied by copies of any material, published by the authors in the last year, that overlaps the content of the manuscript. This should include preliminary notes, communications, abstracts, chapters or reviews. Please also include any 'in press' or submitted articles. These should be submitted as 'Supplemental files' in PDF format, and reference made to them in the authors' cover letter.

Enquiries should be sent to:

Experimental Physiology  
Publications Office  
PO Box 502  
Cambridge  
CB1 0AL  
UK  
Tel: + 44 (0)1223 400180  
Fax: + 44 (0)1223 246858  
Email: [journals@physoc.org](mailto:journals@physoc.org)

Manuscripts should be submitted initially as PDF files; numbered figures and tables should be included in the PDF file in the first instance. Authors are required to agree to the terms set out in the publisher's Exclusive Licence Form. This is now part of the online submission process. **A printed signed agreement is no longer required.** If your paper contains colour figures, a completed Colour Work Agreement Form, available on the submission system, must be scanned and uploaded with your submission or faxed or emailed to the Publications Office. To facilitate the reviewing process the submitted manuscript should be formatted with the body text in 12 point Times New Roman, or a similar font, and line spacing of 1.5. Text should be left-aligned and surrounded by 3 cm margins. The formatting of text and headings will be removed during the production process and replaced with journal styles. Upon acceptance a Word file of the manuscript will be required. High-quality figure files will be requested if necessary. For detailed instructions for preparation of figures see Guidelines for preparing figures.

**Correspondence.** All correspondence should be addressed to the Publications Office.

The Editors cannot accept responsibility for loss of files submitted to them. Contributors are advised to keep copies of all text and figure files during the review process.

**Date of receipt.** The date of receipt of each paper will be printed and is normally the date on which the manuscript is first received in the Publications Office. Papers submitted without all the information specified in these instructions will not be given editorial consideration until it has been provided; this applies especially to aspects of animal welfare/ethics. The date of

receipt published will then refer to the date when the complete submission was received. If an author fails to deal with requested revisions within a reasonable time (usually one month) the date of original receipt will be replaced by the date on which the new version was received in the Publications Office.

[\[Back to top\]](#)

---

## **THE REVIEW PROCESS**

Members of the Editorial Board are responsible for editing a paper or assigning it to an appropriate Expert Referee. It is the policy of Experimental Physiology that each paper is independently reviewed by two Expert Referees, overseen by the relevant Editor. It is the aim of the Editorial Board that authors should receive an Editorial Report within 4 weeks of receipt of the complete manuscript in the Publications Office.

When submitting a manuscript authors should specify one of the subject areas listed below and appropriate Editor(s) (see [Scope](#) and subject areas). See [\[PDF\]](#) for further details of Editors' expertise.

Authors are also encouraged to supply the names of up to three referees.

See [Journal policy: conflict of interest](#)

[\[Back to top\]](#)