

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÍVEL - DOUTORADO

INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL EM
PARÂMETROS IMUNES DE RATOS TREINADOS E
SUBMETIDOS
AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO

MARCELO TAVARES VIANA

RECIFE, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÍVEL - DOUTORADO

INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL EM
PARÂMETROS IMUNES DE RATOS TREINADOS E
SUBMETIDOS
AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO

Tese apresentada pelo aluno Marcelo Tavares Viana, ao programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde – CCS, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, para obtenção do título de Doutor em Nutrição, com área de concentração em Bases Experimentais. Orientado pela Profª Drª Célia Maria Machado Barbosa de Castro, da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

RECIFE, 2009

Viana, Marcelo Tavares

Influência da desnutrição neonatal em parâmetros imunes de ratos treinados e submetidos ao estresse de contenção / Marcelo Tavares Viana. – Recife : O Autor, 2009.

118 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Desnutrição neonatal – Sistema imune. 2. Estresse de contenção – Desnutrição neonatal. 3. Exercício físico – Desnutrição neonatal. I. Título.

613.221

CDU (2.ed.)

UFPE

612.3

CDD (22.ed.)

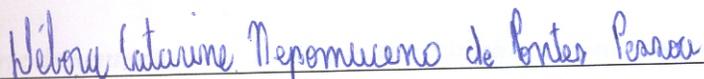
CCS2009-073

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
NÍVEL - DOUTORADO

INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO NEONATAL EM PARÂMETROS
IMUNES DE RATOS TREINADOS E SUBMETIDOS
AO ESTRESSE DE CONTENÇÃO

MARCELO TAVARES VIANA

Tese aprovada em 18 de Fevereiro de 2009



Profª Drª Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa (PG em Nutrição / UFPE)



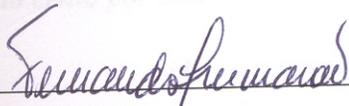
Profª Drª Tânia Lúcia Montenegro Stamford (PG em Nutrição / UFPE)



Profª Drª Armele de Fátima Dornelas de Andrade (Depto. de Fisioterapia / UFPE)



Profª PhD. Rosa Amália Fireman Dutra (Universidade de Pernambuco / UPE)



Prof. PhD Fernando José de Sá Pereira Guimarães (Universidade de Pernambuco/ UPE)

RECIFE, 2009

“Naquele mesmo dia, Jesus, tendo saído de casa, sentou-se perto do mar; e se reuniu ao seu redor uma grande multidão de povo; por isso, ele subiu num barco, onde se sentou, todo povo estando na margem; e lhes disse muitas coisas por parábolas, falando-lhes desta maneira:

Aquele que semeia, saiu a semear; e, enquanto semeava, uma parte da semente caiu ao longo do caminho, e vindo os pássaros do céu a comeram.

Outra caiu nos lugares pedregosos, onde não havia muita terra; e logo nasceu porque a terra onde estava não tinha profundidade. Mas o Sol tendo se erguido, em seguida, a queimou; e como não tinha raízes secou.

Outra caiu nos espinheiros, e os espinhos, vindo a crescer, a sufocaram.

Outra, enfim, caiu na boa terra, e deu frutos, alguns grãos rendendo cento por um, outros sessenta e outros trinta.

Que ouça aquele que tenha ouvidos para ouvir.”

(O Evangelho Segundo o Espiritismo, Cap. XVII, v. 5 e 6).

AGRADECIMENTOS

Esse talvez seja um dos momentos mais difíceis de um trabalho acadêmico, pois, algumas pessoas passam, mas, outras, marcam. Neste sentido, faz-se necessário agradecer à minha orientadora, Prof^a Dr^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro por sua simplicidade, competência e ética profissional. Pela confiança e liberdade que me foram dadas para conduzir este trabalho. Que a ciência tenha sempre o privilégio de receber sua contribuição. Obrigado por tudo!

Ao Prof^o Dr. Raul Manhães pela oportunidade que me foi dada em participar de seu grupo de pesquisa, sem o qual este trabalho, talvez, não existisse. Obrigado pela confiança, carinho e respeito. Valeu pelo convite!

Aos funcionários e professores do Departamento de Nutrição da UFPE pela oportunidade de tê-los conhecido e convivido durante esses quatro anos.

Aos colegas, estagiários e todo o pessoal do LIKA e LAFINNT pela colaboração, em especial à Soraya dos Santos Silva, Ricardo Braz Ferreira da Silva e Douglas Fonseca pela amizade e colaboração no dia-a-dia.

A Fátima Diniz, pela atenção e carinho. Obrigado por sua amizade !

Ao Dr. França e a seu Paulino, pelas orientações na forma adequada de lidar com os animais de laboratório. Sem vocês eu não teria tanto respeito à vida desses pequenos seres. Obrigado pela amizade!

Aos colegas de turma. Obrigado pela oportunidade de tê-los conhecido e vivido bons momentos.

Ao Prof^o Ms. Tetsuo Tashiro por discutir ciência de uma forma simples, clara e precisa. A fundamentação teórica sempre lhe acompanha. Que a ciência tenha a honra de sua contribuição.

Aos irmãos e amigos Ribas, Rômulo e Fernando pelo carinho e apoio em todos os momentos. Mesmo sem a consangüinidade, estamos juntos mais uma vez. Que a produção do conhecimento seja uma referência em nossas vidas. Obrigado pelo carinho de vocês.

Ao meu irmão e amigo Luizinho que, sempre que pode, traduziu para esta fase da minha vida, algumas orientações daqueles que nos acompanham e essas também contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado. Obrigado meu irmão !

A minha esposa Manuella Perez, pelo carinho, paciência e cumplicidade. Sem você, talvez eu não tivesse percebido alguns dos ensinamentos que a vida nos proporciona.

Em especial, aos animais! Sem eles, a ciência não seria a mesma. **TODO MEU RESPEITO.**

Aos nossos orientadores espirituais, que nos acompanham e direcionam a um caminho de luz. Sem vossas orientações nos passaríamos, mas, não cumpriríamos nossa missão da melhor forma possível. Obrigado mais uma vez.

DEDICATÓRIA

À Manuella Perez.

Com Amor !

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	14
2. HIPÓTESES	16
3. OBJETIVOS	
3.1 Geral	17
3.2 Específico	17
4. REFERENCIAL TEÓRICO	18
5. MÉTODOS	25
5.1 Amostras, peso corporal, estado nutricional e treinamento físico moderado	25
5.2 Indução do estresse de contenção – EC	28
5.3 Análise da microbiota oral do animais	29
5.3.1 Coleta de material para cultura	29
5.3.2 Bacterioscopia, semeio, isolamento e identificação bacteriana	29
5.3.3 Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
5.3.4 Identificação de <i>Streptococcus</i>	31
5.3.5 Identificação de <i>Bacillus sp.</i> e <i>Corynebacterium sp.</i>	32
5.3.6 Identificação de <i>Bacillus</i> Gram negativos	32
5.4 Análises dos parâmetros leucocitários e hematimétricos	33
5.5 Obtenção dos macrófagos do lavado broncoalveolar	35
5.6 Obtenção da cultura dos macrófagos alveolares	35
5.7 Taxa de fagocitose de macrófagos alveolares	36
5.8 Produção de Óxido Nítrico por macrófagos alveolares	36
5.9 Construção da curva padrão	37
5.10 Processo de revelação da curva padrão e das amostras	37
5.11 Análise estatística	38

6. RESULTADOS – ARTIGOS ORIGINAIS	40
ARTIGO I	40
O efeito do treinamento físico moderado e da desnutrição precoce sobre a microbiota oral normal de ratos adultos	
ARTIGO II	64
Adaptação leucocitária, hematimétrica e morfológica ao treinamento físico moderado de ratos desnutridos precocemente	
ARTIGO III	87
A desnutrição precoce não alterou a produção de óxido nítrico, taxa de fagocitose, resposta leucocitária e hematimétrica em ratos treinados e submetidos ao estresse de contenção	
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
9. ANEXOS	117
9.1 Anexo I - Parecer do comitê de ética	117
9.2 Anexo II - Documentação de encaminhamento do artigo I	118
9.3 Anexos III - Documentação de encaminhamento do artigo II	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise da evolução ponderal dos animais	25
Figura 2 - Programa de treinamento físico moderado (50 a 65% do $V_{O_2 \text{ máx.}}$)	25
Figura 3 - Treinamento físico moderado em esteira rolante	26
Figura 4 - Descrição dos grupos experimentais	26
Figura 5 - Estresse de contenção	27
Figura 6 - Coleta de bactérias na cavidade oral de ratos	27
Figura 7 - Swab colocado em BHI	28
Figura 8 - Semeio feito em Ágar sangue	28
Figura 9 - Estufa bacteriológica para crescimento bacteriano	28
Figura 10 - Contador de colônias	28
Figura 11 - Identificação das bactérias pelo método de bacterioscopia	30
Figura 12 - Hemocitômetro	32
Figura 13 - Esfregaço sanguíneo	33
Figura 14 - Traqueostomia	33
Figura 15 - Curva Padrão	36

LISTA DE ABREVIATURAS

TFM -	Treinamento Físico Moderado
EROs -	Espécie Reativa de Oxigênio
PCT -	Peso Corporal Total
T₁ -	1ª Semana de treino
T₈ -	8ª Semana de treino
EC -	Estresse de Contenção
T₀ -	Tempo Zero (Referência basal)
LBA -	Lavado broncoalveolar
DN -	Desnutrição Neonatal
N -	Nutrido
D -	Desnutrido
GNC -	Grupo Nutrido Controle
GNT -	Grupo Nutrido Treino
GDC -	Grupo Desnutrido Controle
GDT -	Grupo Desnutrido Treino
ANOVA -	Análise de Variância

RESUMO

Objetivo: Analisou-se a influência da desnutrição neonatal **DN** em parâmetros imunes de 36 ratos Wistar machos adultos jovens (60 dias), treinados ou não e submetidos ao estresse de contenção **EC**. **Métodos:** Nos grupos nutridos (caseína 17%) e desnutridos (8%) foram avaliados leucócitos totais (hemocítômetro) e diferenciais (esfregaço sanguíneo); hemoglobina (cianometemoglobina); hematócrito (micro-hematócrito); hemácias (hemocítômetro); óxido nítrico (reação de Griess); taxa de fagocitose (percentual de macrófagos que englobaram o fungo), microbiota oral **MO** e peso corporal **PC**. Os grupos treinos realizaram um **TFM** em esteira (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas). No **EC**, o animal foi contido em cano PVC (24 cm de comprimento x 8 cm de diâmetro) durante 40 minutos pós - **TFM** (24horas). Utilizou-se o teste t Student pareado, não pareado e ANOVA ($p < 0,05$), com média e desvio padrão.

Resultados: **No artigo:** *“O efeito do treinamento físico moderado e da desnutrição precoce sobre a microbiota oral normal de ratos adultos”*, o **TFM** e a **DN** reduziram a **MO** e alteraram o padrão bacteriano nos desnutridos. **No Artigo:** *“Adaptação leucocitária, hematimétrica e morfológica ao treinamento físico moderado de ratos desnutridos precocemente”*, o **TFM** parece ter causado adaptação fisiológica a partir da 1ª semana no **PC** e nas células sanguíneas no desnutrido treino **DT**. **No Artigo:** *“A influência da desnutrição neonatal na produção de óxido nítrico, taxa de fagocitose, resposta leucocitária e hematimétrica de ratos treinados e submetidos ao estresse de contenção”*, o **TFM** e a recuperação nutricional atenuaram as repercussões causadas pela **DN** e o **EC** no **DT**.

Termos de indexação: Exercício físico, desnutrição neonatal, sistema imune
microbiota oral, estresse de contenção

ABSTRACT

Objective: The neonatal malnutrition (NM) influence was analyzed in immune parameters of 36 Wistar young adults (60 days) male rats, trained or not and submitted to the contention stress (CS). **Methods:** In the nurtured groups (casein 17%) and malnourished (8%) they were appraised total leukocytes (hemocytometer) and differentiate (blood smears); hemoglobin (cyanomethemoglobin); hematocrit (microhematocrit); red blood cell (hemocytometer); nitric oxide (Griess reaction); phagocytes rate (percentile of macrophages that phagocytes the mushroom), oral microbiota and body weight BW. The trainings groups accomplished a moderate physical training (MPT) in wake (60min./dia, 5 days/week, for 8 weeks). In CS, the animal was contained in PVC pipe (24 cm-length x 8 cm-diameter) for 40 minutes after - MPT (24horas). The paired, non-paired t-test and ANOVA were used ($p < 0.05$), with average and standard deviation. **Results: On article:** *“The moderate physical training and precocious malnutrition effect on the normal oral microbiota of adult rats”*, the **MPT** and **NM** reduced the **OM** and alter the bacterial pattern of the undernourished ones. **On article:** *Adaptation leukocyte, hematimetric and morphologic to the moderated physical training of early undernourished rats*", MPT seems to have caused physiologic adaptation from to 1st week in the BW and in the blood cells in the malnourished train MT. **On article:** *The neonatal malnutrition influence in the nitric oxide production, phagocytes rate, leukocytes response and hematimetric of trained rats and submitted to the contention stress, MPT and the nutritional recovery attenuated the repercussions caused by NM and CS in MT.*

Indexation terms: physical exercise, malnutrition neonatal, immune system

oral microbiota , contention stress

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 25 anos, a desnutrição em crianças apresentou um declínio cumulativo de 72%, enquanto em adultos sua prevalência baixou em 49% no meio rural e 52,7% no meio urbano (IBGE, 2000). Esse pressuposto indica mudanças no perfil epidemiológico de populações com baixas condições de vida, supondo níveis aceitáveis de desenvolvimento nos grupos socialmente mais expostos. Mesmo considerando esses avanços, o estudo da desnutrição ainda se faz necessário, a fim de tentar minimizar os insultos provenientes de seus efeitos (BATISTA FILHO, RISSIN, 2003)

As interferências da carência alimentar sobre parâmetros fisiológicos em humanos e animais são bem conhecidas (BIORVEL, 1985). A desnutrição pode induzir o estresse físico, bioquímico ou psicológico, desencadeando respostas específicas a diferentes tipos de estímulos (SELYE, 1956). Logo, um suprimento adequado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento e homeostasia dos sistemas orgânicos, entre eles, o imune (CHANDRA, 1997). Este parece sensível às alterações nutricionais, as quais podem intervir na dinâmica e função de suas células (BESEDOVSKY, DEL REY, 1996).

O estudo da desnutrição protéica em modelos animais tem procurado verificar sua associação à recuperação nutricional e ao exercício físico (PAPOTI et al., 2003), quer na fase intra-uterina, neonatal ou de desenvolvimento (SILVA et al., 1999). Porém o restabelecimento das variáveis metabólicas é lento, entretanto, o exercício pode beneficiar a recuperação nutricional (SANTHIAGO et al., 2006). O treinamento físico moderado **TFM** induz alterações imunológicas, estando associado com a redução da susceptibilidade a infecções de vias aéreas superiores (LAPIN et al., 2007).

As alterações desencadeadas pelo **TFM** promovem ajustes homeostáticos (MORASKA et al, 2000), sejam como uma resposta a um estresse físico (DA CRUZ, 2006) ou a pré-disposição de adaptação ao treino, sejam em fases de recuperação nutricional ou não. Essa adaptação pode gerar uma maior demanda energética ao sistema cardiorrespiratório, melhorando sua capacidade aeróbia, utilização de substratos energéticos para o processo de contração e relaxamento dos músculos, captação pulmonar, transporte sanguíneo e captação celular de oxigênio (OLIVEIRA, RAMIRES, LANCHÁ JÚNIOR, 2004).

Poucos estudos utilizando protocolo de **TFM** caracterizaram o impacto da desnutrição neonatal, recuperação nutricional e o estresse de contenção sobre parâmetros imunes, em cada fase experimental do treinamento. Esse procedimento identificou detalhadamente a influência de cada fator estudado, em função das respostas obtidas por suas variáveis. Desta forma, analisou-se a influência da desnutrição precoce e do treinamento físico moderado sobre as alterações em parâmetros imunes e hematimétricos de ratos adultos submetidos ao estresse de contenção.

2. HIPÓTESES

A desnutrição precoce, mesmo após a recuperação nutricional, reduz o peso corporal, o número das células sanguíneas e a função das células fagocitárias, além de aumentar o número de bactérias da microbiota oral normal, de ratos adultos submetidos ao estresse de contenção.

O treinamento físico moderado em ratos adultos desnutridos precocemente, associado à recuperação nutricional, atenua a redução do peso corporal, mantém ou aumenta o número das células sanguíneas, melhora a função de células fagocitárias, além de reduzir o número de bactérias da microbiota oral normal, após estresse de contenção.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar influência da desnutrição precoce em parâmetros imunes de ratos treinados e submetidos ao estresse de contenção

3.2 Objetivos específicos

- a) Acompanhar a evolução ponderal dos animais;
- b) Caracterizar quantitativamente e qualitativamente os leucócitos e os índices hematimétricos do sangue periférico;
- c) Mensurar a taxa de fagocitose e produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares;
- d) Avaliar a microbiota oral normal e
- e) Comparar as respostas de algumas variáveis analisadas antes e após a contenção.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

A desnutrição é uma síndrome carencial cujas manifestações dependem da intensidade e duração da deficiência alimentar, de patologias associadas e da fase de desenvolvimento biológico do indivíduo (BATISTA FILHO, RISSIN, 2003). Essa deficiência acarreta prejuízo ao desenvolvimento dos órgãos e sistemas, em especial daqueles que controlam a homeostase como o nervoso, endócrino e imunológico (MORASKA, 2000). A desnutrição protéica implica em diversas alterações fisiológicas e metabólicas (SANTHIAGO et al., 2006), as quais têm sido relacionadas à depressão do sistema imune.

Como parte da primeira linha de defesa da imunidade inespecífica, a superfície corporal da pele e as mucosas podem ser a porta de entrada (PASTER et al., 2001) de microorganismos que poderão causar infecção, seja por uma imunossupressão do hospedeiro ou por sua instalação em outros sítios corpóreos (PELCZAR JÚNIOR, CHAN, KRIEG, 1996). A cavidade oral *in útero* é estéril, mas poucas horas após o nascimento, desenvolve-se uma microbiota oral simples (WILKINS, 2004). Essa pode variar com a idade, hábitos alimentares, estado nutricional, fluxo salivar e condições imunológicas.

Alguns microrganismos da microbiota oral normal podem se transformar em patógenos oportunistas, onde seu acúmulo na cavidade oral pode desencadear um estado infeccioso, estimulando o sistema imune à uma resposta inflamatória. Em indivíduos saudáveis, algumas espécies de bactérias da microbiota oral podem causar cáries em até 80% da população (VICENTE, 2004). Essas podem ser induzidas por alterações na umidade, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes da cavidade oral (WILKINS, 2004).

Na fase adulta, a microbiota oral torna-se altamente complexa, composta por cerca de 500 grupos bacterianos (GUTIERREZ-PEREZ et al., 2004), os quais se localizam principalmente no dorso da língua, sulco gengival e na placa dental (GUTIERREZ-PEREZ et al., 2004). Estima-se que a saliva contenha cerca de 10^8 bactérias/mL e as placas dentais, 10^{11} bactérias/mL⁶. A estrutura anatômica da cavidade oral de humanos apresenta diferenças em alguns aspectos quanto ao de roedores. Contudo, em relação à microbiota oral normal, tem uma composição semelhante (WILKINS, 2004).

As bactérias com maior predominância na microbiota normal oral de ratos são os *Lactobacillus murinus*, os *Streptococcus spp*, os *Enterococcus faecalis* e os *Staphylococcus spp* (KOLLER et al., 2000). Na mucosa, foi encontrado em altas proporções o *L. murinus*, já nos dentes o *E. faecalis*, o qual se deve ao hábito de coprofagia dos ratos (TRUDEL et al., 1986). A forma e a frequência de alimentos consumidos têm um efeito direto sobre o ambiente microbiano oral. Tais aspectos são importantes no desenvolvimento dental, na integridade dos tecidos gengivais e orais, prevenção e tratamento das doenças da cavidade oral (TRUDEL et al., 1986).

Uma dieta inapropriada, carente em um ou mais nutrientes essenciais pode causar um desequilíbrio na microbiota oral normal. Neste sentido, a desnutrição é apontada como uma das principais causas de deficiência secundária da resposta imune do organismo aos agentes patogênicos (TOUGER-DECKER, 2005). Mesmo após a recuperação nutricional, os mecanismos imunitários podem estar comprometidos (CHANDRA, 1997). Os efeitos da desnutrição são caracterizados por induzir alterações no desenvolvimento e função das células que participam da resposta imunológica (MALAGUEÑO et al., 1998), entre elas o macrófago.

Os macrófagos, assim como todas as células do sistema imunológico, originam-se de células indiferenciadas presentes na medula óssea. Além de exercerem atividade fagocítica intensa, secretam enzimas, proteínas plasmáticas, prostaglandinas, citocinas e Espécies Reativas de Oxigênio - EROs (superóxido, radical hidroxila, ácido hipoclorito) e Nitrogênio (Óxido Nítrico) (PEREIRA, 1996). As repercussões nutricionais em macrófagos são bem conhecidas, principalmente quanto à produção desses radicais livres – RLs (LEITE, SARNI, 2003).

Um estudo observou que, em animais desnutridos durante a lactação e estressados psicologicamente quando adultos, ocorria uma diminuição na produção de superóxido por macrófagos (QUEIROS-SANTOS, 2000). Logo, as conseqüências das agressões nutricionais, parecem estar associadas a sua magnitude e a fatores ambientais a que são submetidos os indivíduos atingidos (QUEIROS-SANTOS, 2000). Além disso, as EROs têm sua produção alterada pela carência do consumo da vitamina E, a qual inibe a ativação da NADPH oxidase (LEITE, SARNI, 2003).

A NADPH oxidase (LEITE, SARNI, 2003) é um complexo enzimático associado às membranas plasmáticas dos macrófagos, sendo formado pela via das pentoses, presente no citoplasma dessas células (KIM et al., 2003). Sua geração é importante para a função celular, já que em situações de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (principal enzima reguladora da via das pentoses) em fagócitos, a susceptibilidade às infecções é alta (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1989). Outra alteração, na carência de vitamina E, foi a queda das defesas antioxidantes enzimáticas superóxido desmutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPX), modificando a estrutura e a função de macrófagos (PEREIRA, 1996).

As EROs liberadas por macrófagos são substâncias oxidantes que atuam contra agentes patogênicos. Entretanto, podem modificar o DNA destas células, o que leva a

um aumento adicional do suprimento de nucleotídeos para reparo dessa região (CASTELL, NEWSHOLME, 1998). Portanto, se estes sítios metabólicos que são precursores de DNA e RNA não conseguirem ser supridos na mesma velocidade com que são requisitados podem influenciar a função imune tanto de macrófagos quanto de linfócitos (NEWSHOLME, 1991).

A modulação de EROs por macrófagos tem sido descrita recentemente como um importante papel biológico no desbalanço redox temporário, já que esse mecanismo celular regula o metabolismo, a resposta imunológica, a regulação vasomotora, adesão, proliferação e morte celular (KIM, 2003). Entretanto, a desnutrição pode romper essa modulação, alterando a função de macrófagos e outras células imunes, como os leucócitos, induzindo ao estresse oxidativo (HALLIWEL, GUTTERIDGE, 1989). Essas alterações parecem inibir a liberação de substâncias anti-oxidantes causando danos celulares, teciduais e aos líquidos corpóreos.

As substâncias anti-oxidantes são constituídas por ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, substâncias hidrossolúveis e enzimas derivadas principalmente da dieta, como nos casos da vitamina E, C, beta caroteno e dos elementos-traços zinco, cobre e selênio (LEITE, SARNI, 2003). Na carência desses elementos, os oxidantes inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Fator de Necrose Tumoral; interleucina – 1 / 2 / 6 e 8; fatores de crescimento hematopoiéticos, moléculas de adesão celular e Óxido Nítrico Sintase - NOS) pela ativação do fator nuclear *Kappa B* (NF *kappa B*), que exerce uma função central de transcrição, regulando numerosos genes pró-inflamatórios (LEITE, SARNI, 2003).

O estresse oxidativo induzido pela carência de nutrientes parece modular as respostas imunes. No entanto, o estudo da desnutrição protéica em modelos animais tem procurado verificar sua associação à recuperação nutricional e ao exercício físico, na

tentativa de atenuar essas repercussões, quer na fase intra-uterina, neonatal ou de desenvolvimento (PAPOTI et al., 2003). Porém o restabelecimento das variáveis metabólicas é lento, entretanto, o exercício físico pode beneficiar a recuperação nutricional (SILVA et al., 1999; SANTHIAGO et al., 2006), pois, seus efeitos sobre os diversos sistemas fisiológicos são bem conhecidos.

Quando o exercício físico é regular e moderado acarreta melhoria no sistema cardiovascular e respiratório (HENNESSY; WATSON, 1994), endócrino (GAILLARD, 1994) e imunológico (LEANDRO et al. 2002). Foi observado que o treino físico moderado de natação reverteu um quadro de diminuição da atividade fagocítica de macrófagos alveolares em ratos submetidos a um estresse psicológico (NASCIMENTO et al., 2004). As interações entre exercício físico e sistema imune são complexas, uma vez que as alterações ocorridas no organismo durante o exercício extenuante são semelhantes às encontradas em outras formas de estresse físico e psicológico (LANDMANN et. al. 1984; NEHLSSEN 1998; HOFFMAN-GOETZ, PEDERSEN 1994).

Na realização do exercício físico moderado, há liberação de catecolaminas, endorfinas e cortisol, os quais parecem mediar muitos efeitos imunossupressores induzidos pelo estresse (BRENNER et al, 1998). Os glicocorticóides em pequenas quantidades melhoram a função imune, mas, em altas doses, podem ser deletérios, aumentando a taxa de depleção protéica, reduzindo as reservas de aminoácidos necessários para a síntese de células B (linfócitos B) e imunoglobulinas (NEWSHOLME, 1991), além de estimular a apoptose de timócitos e causarem linfocitopenia, monocitopenia e neutrofilia (BRENNER et al, 1998). A liberação de catecolaminas e glicocorticóides induzida pelo estresse psicológico de contenção, tal como sessões exaustivas de exercício físico intenso (estresse agudo), podem causar uma

imunossupressão no hospedeiro (COSTA ROSA, VAISBERG, 2002). Não se verificou a redução dos valores dos leucócitos totais em animais nutridos treinados (natação) e submetidos à análise pré e pós estresse psicológico de contenção (NASCIMENTO et al., 2004). Outro estudo que induziu a contenção, sem realizar treinamento físico moderado, não identificou alteração, em praticamente, todos os leucócitos diferenciais (QUEIROS-SANTOS, 2000; PIKANÇO-DINIZ et al., 2004).

Alguns estudos demonstraram que o estresse crônico, como o Treinamento Físico Moderado **TFM**, parece interferir a imunorregulação dos glicocorticóides (COSTA ROSA, VAISBERG, 2002; GREEN, CROAKER, ROWBOTTOM, 2003). Essas condições foram observadas no aumento significativo do número de leucócitos totais circulantes de ratos treinados que realizaram exercício físico agudo moderado (5 min.) em relação ao leve (5 min.) (PEDERSEN, HOFFMAN-GOETZ, 2000). Foi observado um aumento na contagem de linfócitos em um grupo de ratos pós - **TFM** agudo de natação até a exaustão (DIAS et al., 2007) e em outro submetido a 8 semanas de **TFM** em esteira rolante (BRICKS, 1994).

Sessões de exercícios regulares em intensidades submáximas não alteraram a contagem de linfócitos (ARAÚJO et al., 2004). Todavia, identificou-se leucocitose e linfocitose em ratos submetidos a 5 e 15 min. de treino agudo e moderado (SANTHIAGO et al., 2006). Em outro estudo, identificou-se uma redução no número de linfócitos e aumento nos neutrófilos de ratos do grupo controle, além do aumento do número dessas células no grupo treinado após a contenção, comparados ao controle, entretanto, nas demais células, não houve diferença entre os grupos experimentais (NASCIMENTO et al., 2004).

O **TFM**, enquanto estresse físico e crônico, melhora a captação, a absorção e o fluxo de oxigênio orgânico, melhorando a capacidade funcional do indivíduo

(OLIVEIRA, RAMIRES, LANCHÁ JÚNIOR, 2004). Neste sentido, o exercício pode induzir também alterações na série vermelha do sangue. Os animais são capazes de estocar grande quantidade de eritrócitos no baço e, numa condição de estresse, expeli-los na circulação. Esse mecanismo é resultado da contração da musculatura lisa do baço, que diminui seu volume (STEWART, McKENZIE, 2002). Logo, o **TFM** pode provocar adaptações no fornecimento de oxigênio, com o possível aumento das concentrações de 2,3 difosfoglicerato nos eritrócitos (STEWART, McKENZIE, 2002; SILVA et al., 1999).

O composto eritrocitário une-se a subunidade da molécula de hemoglobina, reduzindo sua afinidade com o oxigênio, disponibilizando-o para os tecidos (SILVA et al., 1999). Esse fato foi confirmado no aumento do hematócrito e da hemoglobina de ratos submetidos ao estresse agudo (KUWUAHIRA, KAMIYA, IWAMOTO, 1999; (STEWART, McKENZIE, 2002). Entretanto, esse processo parece não ter induzido respostas nos índices hematimétricos de ratos submetidos a um **TFM** de 6 semanas de natação e ao estresse de contenção (24 horas após a última sessão de treino). Talvez essas diferenças de resultados estejam relacionadas à indução do tipo de estresse.

As relações entre Desnutrição Neonatal, Sistema Imune, Estresse Psicológico e o Treinamento Físico Moderado estão longe de ser totalmente diagnosticadas. As especificidades inerentes a cada fator e suas interações tornam-se alvo de novas pesquisas, caracterizando a complexidade dessas áreas tão distintas, mas, relacionadas. Nosso trabalho buscou minimizar a amplitude dessas relações, corroborando com as interveniências que nos foram propostas, possibilitando o estabelecimento de novas perspectivas de trabalho na área de saúde.

5. MÉTODOS

5.1 Amostras, peso corporal, estado nutricional e treinamento físico moderado.

Utilizaram-se 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. O biotério central é mantido a uma temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo invertido de 12 horas (claro – 21h00 às 09h00; escuro – 09h01 às 20h59). Nesse biotério, os animais são criados em gaiolas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*. Os animais adultos que originaram as amostras foram encaminhados ao biotério experimental com ciclo invertido (claro: 20h00 as 08h00 e escuro: 08h01 as 19h59), onde, antes de iniciar a cópula, passaram por um período de 15 (quinze) dias de adaptação ao novo ambiente.

O acasalamento foi feito numa proporção de um macho para duas fêmeas. A prenhe foi observada pelo aumento do ventre das fêmeas, as quais foram colocadas em gaiolas individuais até o parto. Considerou-se o primeiro dia pós-parto como o início do aleitamento, onde os grupos foram compostos por seis filhotes machos por mãe. Estas foram divididas em um grupo desnutrido, com dieta hipoprotéica (caseína 8%) e um nutrido, com normoprotéica (caseína 17%) (tabela 1). Os filhotes receberam a dieta de forma indireta, a partir do leite materno.

Tabela 1 - Composição das dietas caseína 8% e 17% administradas durante o período experimental

Ingredientes	Caseína 8% (g)	Caseína 17% (g)
Caseína	79,3	179,3
Mix vitamínico	10,0	10,0
Mix mineral	35,0	35,0
Celulose	50,0	50,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
DL- Metionina	3,0	3,0
Óleo de soja	70,0 mL	70,0 mL
Amido de milho	750,2	650,2

* Composição das dietas segundo a AIN-93G

A partir do vigésimo segundo dia de vida (desmame), as mães foram submetidas a ortanásia e os filhotes divididos em três por gaiola, de acordo com a dieta consumida no período neonatal e passaram a consumir labina. Esta é adotada como dieta padrão no biotério central, pois contém 23% de proteínas mistas (tabela 2).

Tabela 2 - Composição centesimal da dieta padrão “Labina”^{a,b} administrada durante o período experimental

Enriquecimento (kg de ração)		Enriquecimento (kg de ração)		Níveis de garantia (%)	
Vitamina A	28000UI	Piridoxina	12mg	Umidade (máx.)	13
Vitamina D ₃	44000UI	Biotina	0,2mg	Proteína (mín.)	23
Vitamina E	90UI	Colina	2800mg	Extrato etéreo (mín.)	2,5
Vitamina K	7mg	Manganês	110mg	Matéria fibrosa (máx.)	9
Vitamina B ₁₂	44mg	Iodo	2mg	Matéria mineral	8
Vitamina B ₂	28mg	Ferro	180mg	Cálcio (máx.)	1,8
Pantetonato de cálcio	100mg	Zinco	110mg		
Niacina	242mg	Cobre	30mg		
Tiamina	12mg	Antioxidante	150mg		
Ácido fólico	14mg	Cobalto	2mg		
Selênio	0,2mg				

^a - Agribrands do Brasil; ^b - Laboratório de experimentação e análise de alimentos – Dep. Nutrição/ UFPE

A dieta padrão foi administrada até o final do experimento pelos grupos (120° dia). O peso corporal total **PCT** dos animais foi mensurado diariamente no período de aleitamento (21 dias) e em dias alternados a partir do 22° dia. Para isso foi utilizado uma balança eletrônica com precisão de 0,1g e capacidade para 4 Kg (Marte, modelo S-2000) (figura 1).

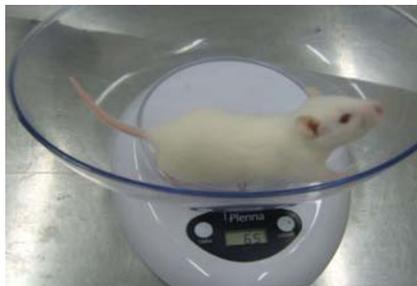


Figura 1 - Análise da evolução ponderal dos animais

Aos sessenta dias de vida, os animais foram divididos de acordo com o **TFM** e da manipulação da dieta (REEVES, NIELSON, FAHEY, 1993). Quanto ao treino, em

treinados ou não; quanto à dieta, em nutridos e desnutridos. Em seguida, subdivididos em nutridos treino (n=6), controle treino (n=6) e normativo (n=6) e seus pares desnutridos. Os grupos treinos foram submetidos a um protocolo de **TFM** (figura 2), em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas – **T₁** a **T₈**) (LEANDRO, 2005) (figura 3). O grupo controle permaneceu em suas gaiolas, as quais foram deslocadas da estante para junto da esteira apenas no momento do treino. Já o normativo, isento do **TFM**, controlou os procedimentos realizados com o controle, mantendo o princípio do experimento.

<p>Tempo Zero – T₀ O momento antes do início do TFM. Primeira amostra sanguínea e da microbiota (referencia basal). Posteriormente, as coletas foram realizadas ao final de cada semana de treino (24 horas).</p>	<p>1ª semana – T₁ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,3 0 5 0,4 0 5 0,5 0 5 0,3 0 5</p>	<p>2ª semana – T₂ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,4 0 5 0,5 0 10 0,6 0 30 0,4 0 5</p>
<p>3ª semana - T₃ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 0 5 0,6 0 10 0,8 0 10 0,9 0 30 0,5 0 5</p>	<p>4ª semana - T₄ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 0 5 0,8 0 10 0,9 0 10 1,1 0 30 0,5 0 5</p>	<p>5ª semana - T₅ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 5 5 0,8 5 10 0,9 5 10 1,1 5 30 0,5 0 5</p>
<p>6ª semana - T₆ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 10 5 0,8 10 10 0,9 10 10 1,1 10 30 0,5 0 5</p>	<p>7ª semana - T₇ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 10 5 0,8 10 10 0,9 10 10 1,1 10 30 0,5 0 5</p>	<p>8ª semana - T₈ Velocidade (km/h) Inclinação Tempo (min) 0,5 10 5 0,8 10 10 0,9 10 10 1,1 10 30 0,5 0 5</p>

Figura 2 - Programa de treinamento físico moderado (50 a 65% do V_{O₂MÁX.})



Figura 3 – Treinamento físico em esteira rolante

5.2 Indução do estresse de contenção - EC

A seguir à última sessão do TFM (24 horas), todos os animais de cada grupo foram induzidos ao estresse (figura 4). Para obtenção do estresse agudo de contenção, os animais foram mantidos em cilindros de plástico PVC (24 cm de comprimento x 8 cm de diâmetro), onde permaneceram imobilizados durante 40 minutos (figura 5) (DE CASTRO et al., 2000).

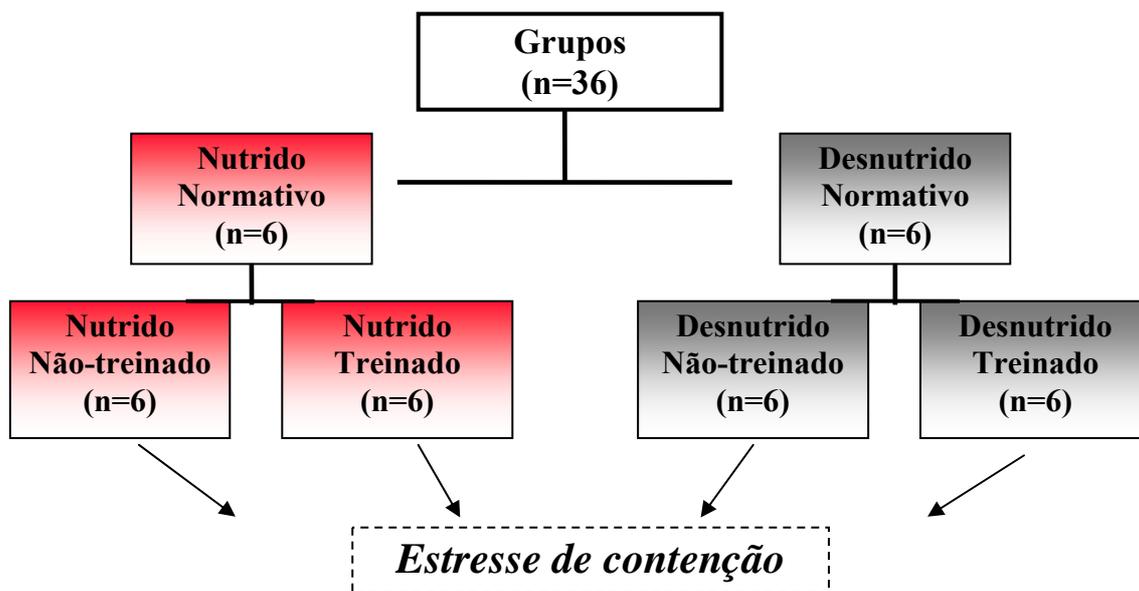


Figura 4 – Descrição dos grupos experimentais

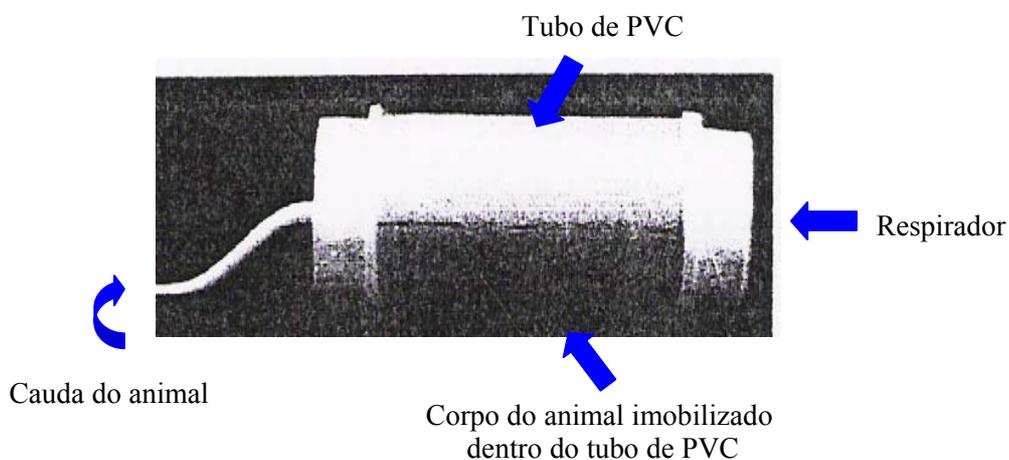


Figura 5 - Estresse agudo de contenção

5.3 Análise da Microbiota Oral dos animais

5.3.1 Coleta de material para cultura

Antes de iniciar o primeiro treino T_0 , foi realizada a coleta de bactérias na cavidade oral dos ratos. Cada animal era segurado na posição vertical, de modo que suas patas fossem imobilizadas. Em seguida, realizou-se a coleta da microbiota oral dos ratos através de Swabs estéreis, embebidos em 40 μ L de solução salina de NaCl 0,9%. Este procedimento foi repetido 24 horas após a última sessão de treino T_8 (figura 6).

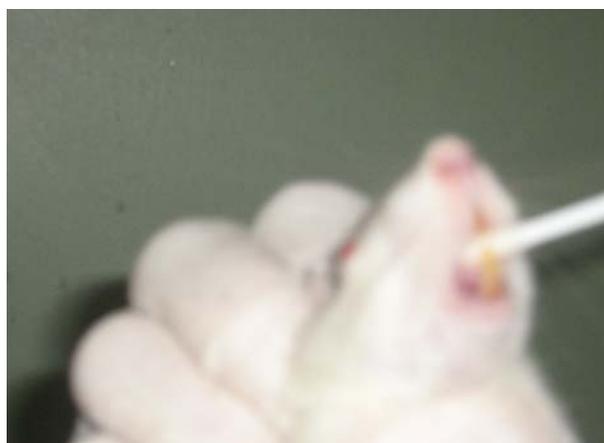


Figura 6 – Coleta de bactérias na cavidade oral dos animais

5.3.2 Bacterioscopia, semeio, isolamento e identificação bacteriana.

Após cada coleta, os Swabs eram colocados em tubos estéreis contendo 960 μ L de BHI (Brain Heart Infusion), meio líquido de enriquecimento que permite o



crescimento bacteriano (figura 7). Através de uma alça de platina calibrada de 1 μ L, retirou-se uma alíquota da amostra previamente homogeneizada e foram confeccionadas lâminas para a coloração de Gram.

Figura 7 – Swab colocado em BHI

Em seguida outra alíquota foi retirada da amostra e semeada em placas de Petri contendo os meios de cultura Agar-sangue e Agar-levine, para o isolamento e identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas respectivamente (figura 8).



Figura 8 – Semeio feito em ágar sangue

As placas eram incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24h (figura 9) e as unidades formadoras de colônia (UFC) que cresceram, foram contadas e identificadas por meio de testes específicos (figura 10).



Figura 9 – Estufa bacteriológica para crescimento bacteriológico



Figura 10 – Contador de colônias

5.3.3 Identificação de *Staphylococcus aureus*

Através da coloração de Gram quando visualizados cocos Gram-positivos em forma de cachos, procurava-se diferenciar o *S. aureus* dos outros *Staphylococcus*, utilizando-se o teste de aglutinação em látex (Staphclin) da Laborclin. Deixava-se os reagentes adquirirem a temperatura ambiente e então numa lâmina limpa e desengordurada, colocava-se uma gota de salina e emulsionava-se duas a quatro colônias suspeitas com auxílio de um palito de madeira. Adicionava-se uma gota do

Staphclin látex na suspensão e com o auxílio de um palito de madeira homogeneizava-se o conteúdo da lâmina. Agitava-se a lâmina em movimentos rotatórios fazendo a leitura do resultado. Suspensão límpida com grumos grandes, teste positivo para *S. aureus*, ausência de grumos teste negativo.

O Staphclin teste ao dar negativo, era realizado o teste de sensibilidade a novobiocina. Fazia-se uma suspensão de 0,5 de MacFarland em meio BHI e, com o auxílio de um Swab, fazia-se o semeio em Ágar sangue e colocava-se o disco de novobiocina. A placa era deixada na estufa por 18-24h e em seguida lia-se o resultado. Bactéria com a novobiocina sensível é chamada de *Staphylococcus coagulase negativa*, e resistente a novobiocina e chamado de *Staphylococcus saprophyticus*.

5.3.4 Identificação de *Streptococcus*

Através da visualização de cocos Gram-positivos em forma de cadeia na coloração de Gram, realizava-se a identificação dos *Streptococcus*. Como toda colônia de *Streptococcus* isolados foram alfa-hemolítico, os testes realizados foram o de sensibilidade à optoquina, a prova da bile esculina e a do NaCl a 6,5%. Para o teste da optoquina, fazia-se uma suspensão bacteriana de 0,5 de MacFarland em meio BHI e com o auxílio de um Swab fazia-se o semeio no Ágar sangue e colocava-se o disco da optoquina. Em paralelo fazia-se semeio em estrias na superfície do tubo contendo Ágar bile esculina inclinado e fazia uma suspensão no NaCl a 6,5%. Colocava-se na estufa e deixava de 24-48h.

O teste da optoquina sendo positivo caracterizava a presença do *Streptococcus pneumoniae*. Caso negativo, com semeio no tubo com bile esculina positivo (verificado pela formação de uma cor enegrecida na superfície do tubo) e turvação do tubo contendo NaCl a 6,5%, essa bactéria era identificada como *Enterococcus sp.* Se apenas

o NaCl fosse negativo, essa bactéria era identificada como *Streptococcus do grupo D*, mas, se desse a optoquina resistente com à bile esculina e o NaCl a 6,5% negativos, a bactéria em questão era o *Streptococcus do grupo viridans*.

5.3.5 Identificação de *Bacillus sp* e *Corynebacterium sp*

Era feita única e exclusivamente pela coloração de Gram. Bacilos Gram positivos com esporos eram identificados com sendo *Bacillus sp*, enquanto que Bacilos Gram positivos em forma de letras chinesas eram identificados como *Corynebacterium sp* (figura 11).



Figura 11 – Identificação das bactérias pelo método de bacterioscopia

5.3.6 Identificação de bacilos Gram negativos

Para a identificação dos bacilos Gram negativos foi usado o kit para enterobactérias da Laborclin. Este Kit era composto por cinco tubos contendo meios de culturas específicos. Um tubo contendo o meio de Rugai sem sacarose, sólido e inclinado com tampa de rosca, um segundo tubo contendo o meio LMI – Lisina, Motilidade e Indol semi-sólido com tampa de rosca, um terceiro tubo contendo o meio MIO – Motilidade, Indol e Ornitina semi-sólido com tampa de rosca, um quarto tubo

contendo o meio de Rhamnose, líquido e com tampa de rosca e por último o meio de citrato sólido e inclinado com tampa de rosca, além da vaselina estéril.

5.4 Análises dos parâmetros leucocitários e hematimétricos

Foram coletadas antes do início do treino T_0 e 24 horas após a última sessão de cada semana de treino (T_1 a T_8), uma pequena alíquota de sangue (0,1 mL) da cauda dos animais, devidamente anestesiados. Dessa, 0,5 mL para realização dos índices hematimétricos (hemoglobina, hematócrito, hemácias) e 0,5 mL para o leucograma (contagem total e diferencial de leucócitos). O sangue extraído foi depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido de uma gota (20 μ L) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA.

Para determinação da hemoglobina utilizou-se 10 μ L de sangue diluído em 5mL de solução hipotônica “técnica de cianometemoglobina” (HAINLINE, 1958). Para tal, obteve-se a extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos e formação do produto colorido cianometemoglobina, a partir da reação da hemoglobina com cianetos. A concentração foi inferida por espectrofotometria (Beckman DU-62) com filtro de 540 nm, expressa em mg/dl através da fórmula: $Hb = DO \text{ da amostra} \times FC$, onde: Hb = concentração de hemoglobina, DO = densidade óptica e FC = fator de conversão.

Os valores de hematócrito foram determinados em percentagem pela técnica de micro-hematócrito em leitor de microcapilar por centrifugação (International Microcapillary Reader. IEC). Para a contagem de hemácias por 1mm^3 de sangue foi utilizada solução tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M com pH=7.4 na proporção de 1:200 em hemocitômetro. Para o cálculo foi utilizada a fórmula: $Hm \times 5 \times 200 \times 10$, onde: Hm = número total de hemácias contadas (em $1/5$ de mm^2); 5 = fator de conversão para 1mm^2 ; 200 = fator de conversão da diluição utilizada; 10 = fator de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina). O resultado foi obtido em número de

células/ml de sangue (LIMA, 2001). Para a contagem total de leucócitos as amostras de sangue foram diluídas (1:200) em solução de TURK (ácido acético a 3%) (STIBBE, WEISE, SEIDEL, 1985).

Os leucócitos totais foram contados em hemocitômetro com auxílio do microscópio óptico, sendo o resultado obtido pela expressão: Leucócitos x mm^3 de sangue = $(Lc. \times 20 \times 10)/4$, onde: Lc = número total de leucócitos contados em 4 mm^2 ; 4 = fator de conversão para 1 mm^3 ; 20 = fator de conversão da diluição utilizada; 10 = fator de conversão para 1 mm^3 (profundidade da lâmina) (figura 12).

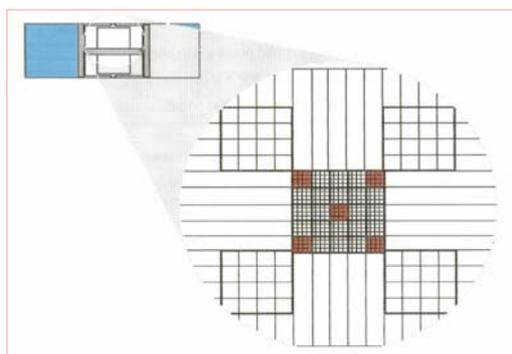


Figura 12 - Hemocitômetro

Na contagem diferencial de leucócitos utilizou-se a técnica do esfregaço sanguíneo e para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico KACIL com teclas correspondentes a cada tipo de célula (figura 13).

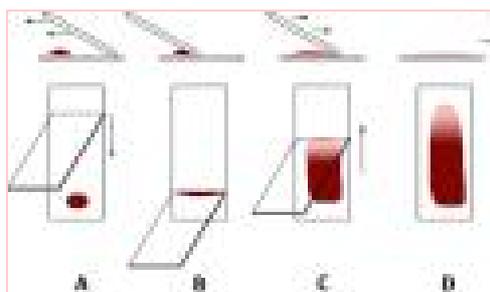


Figura 13 – Esfregaço sanguíneo

5.5 Obtenção dos macrófagos do lavado broncoalveolar (LBA)

O LBA foi obtido de acordo com a técnica usada por De Castro et al (1995) e Bureau et al, (1997). Sob anestesia, o animal foi submetido à cirurgia para exposição da traquéia. O LBA foi realizado, por injeção de soro fisiológico (SF) à temperatura ambiente, através de cânula plástica inserida na traquéia. Pela traquéia, várias alíquotas de 2 mL de SF foram injetadas e imediatamente coletadas. Ao final, foi obtido um volume de 30 mL de LBA para cada animal (figura 14).



Figura 14 - Traqueostomia

5.6 Obtenção da cultura de macrófagos alveolares

O LBA foi centrifugado (10 min, a 470 x g) e as células recuperadas do precipitado. O precipitado de células obtido após centrifugação do LBA foi ressuspenso em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino inativado a 3% (CULTILAB), penicilina-100U/mL, estreptomicina-100 µg/mL e anfotericina B-0.25 µg/mL (SIGMA) em uma densidade de 1×10^6 células/mL.

As células, 1×10^6 células/mL/poço foram colocadas em placa, com 6 poços de 35 mm de diâmetro cada, para cultura de tecido (Placas tipo Falcon). Para adesão, as células foram mantidas na placa por 1h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. As células não aderentes foram descartadas. Posteriormente, essas células foram incubadas por mais 1 h em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) com antibióticos e sem soro fetal bovino.

5.7 Taxa de fagocitose de macrófagos alveolares

Para avaliar a taxa de fagocitose foram utilizados fungos *Saccharomyces sp.* Os fungos foram lavados 3 vezes com Solução Salina Tamponada (SST), contados 10^7 células e em seguida, os fungos foram misturados na suspensão de macrófagos ($1 \times 10^6/1$ mL de meio de cultura RPMI 1640 completo) recuperados do LBA. As células (macrófagos e fungos) foram distribuídas em lâminas para microscopia óptica e incubadas a 37°C , em atmosfera úmida por um período de 1 hora.

Ao ser aguardado o período de 1 hora, as lâminas foram lavadas com SST e secadas a temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. Depois de coradas e secas a temperatura ambiente, as lâminas foram levadas para leitura ao microscópio óptico, lidos com objetiva de 100 sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 200 células.

5.8 Produção de Óxido Nítrico por macrófagos alveolares

Uma vez a adesão celular ocorrida na placa de cultivo, cada poço foi aspirado e lavado com 1mL de solução salina a 0,9%. Neste momento as células foram estimuladas com LPS na dose de $10 \mu\text{g/mL}$. As placas de cultura retornaram à estufa para posteriores leituras em espectrofotômetro, com 24 horas.

5.9 Construção da curva padrão

Para efetuar a dosagem de Óxido Nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito e nitrato das amostras foi necessário realizar uma curva padrão. Para a construção dessa curva foram utilizados reagentes a base da solução de Nitrato de sódio (NaNO_2) 1mM (Solução padrão), meio de cultura RPMI 1640 e reagente de Griess (Solução de revelação) em volumes pré-estabelecidos. As quantidades crescentes da solução padrão

foram adicionadas ao RPMI 1640 para se obter oito (08) soluções de diferentes concentrações (tabela 3).

Tabela 3 – Construção de curva padrão para dosagem de Óxido Nítrico

Solução padrão de nitrito de sódio a 1mM (μL)	Meio de cultura RPMI 1640 (μL)
0	1000
2	998
5	995
10	990
25	975
50	950
75	925
100	900

5.10 Processo de revelação da curva padrão e das amostras

A confecção da curva padrão ocorreu nos momentos das coletas das amostras (figura 15), e as leituras tanto das amostras quanto da curva padrão foram efetuadas após o período de incubação de 24 horas. Para o procedimento das leituras, em espectrofotômetro, foi utilizado um comprimento de onda de 550 nm. Em seguida, foram retirados 500 μ L de cada solução da curva padrão e a mesma quantidade das amostras dos sobrenadantes das culturas de células e misturados a 500 μ L da solução de revelação, para então, após 10 minutos ser realizada a leitura.



Figura 15 – Curva Padrão

No grupo controle as células não receberam tratamento com o LPS. Neste grupo houve apenas 2mL de RPMI 1640 e 500 μ L da solução de revelação. A determinação espectrofotométrica dos níveis de nitrito e nitrato da curva padrão, assim como daqueles liberados nas amostras experimentais foram registradas em absorbância. A partir da determinação dos valores da curva padrão foi possível converter os valores de todas as amostras e assim determinar a quantidade de nitrito e nitrato liberados pelas células dos animais dos diferentes grupos.

As interveniências da **DN** e do **TFM** sobre as variáveis do estudo fundamentaram-se pela avaliação semanal do protocolo de **TFM**. Este caracterizado em antes do início do protocolo de treino ou referência basal (**T₀**); na 1ª semana de treino ou quebra da homeostase (**T₁**); da 2ª a 3ª ou período de transição entre a quebra da homeostase e a estabilização do **TFM** (**T₂** a **T₃**) e da 4ª a 8ª semana ou início do período de adaptação ao treino (**T₄** a **T₈**). Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco sob o ofício nº 76/07 do processo nº 008226/2007-55 e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

5.11 Análise estatística

Para a análise da distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados, utilizou-se os testes ShapiroWillks e Bartlet, respectivamente. Foram utilizados os testes paramétricos t de *Student* pareado, não pareado e ANOVA, para análises intra e entre grupos, dados expressos em média e desvio padrão e $p < 0,05$. Antes da realização das possíveis comparações entre os grupos experimentais, realizou-se a checagem entre os grupos normativos e controles nutridos (**GNN**, **GNC**) e desnutridos (**GDN**, **GDC**) a fim de manter o controle do experimento. Não houve diferença significativa entre as

variáveis dos grupos citados, logo, para todas as comparações, utilizaram-se os grupos nutridos controle **GNC** e treino **GNT** e seus pares desnutridos.

6. RESULTADOS

ARTIGOS ORIGINAIS

ARTIGO I

“O efeito do treinamento físico moderado e da desnutrição precoce sobre a microbiota oral normal de ratos adultos”

short title: Exercício, Desnutrição, Microbiota oral

“The effect of the moderate physical training and the precocious malnutrition on the normal oral microbiota of adult rats”

short title: Exercise, Malnutrition, Microbiota oral

Marcelo Tavares Viana - Autor responsável pelas negociações

- Doutorando em Bases Experimentais da Nutrição – Deptº. de Pós-Graduação em Nutrição – Laboratório de imunopatologia Keizo-Asami, setor de microbiologia clínica – Ageu Magalhães – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Bolsista do CNPQ – E-mail: mtviana0@hotmail.com
- **Endereço para correspondência:** Rua Bom Pastor, nº 1635 / Bloco L / Aptº 301 / Condomínio Sonho Dourado / Bairro: Engenho do Meio / Recife - PE – fone: 32729903 / 96789951

Douglas Leonardo Leite da Fonseca

- Graduando em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – E-mail: doug_fonseca@yahoo.com.br

Manuella Cavalcanti Perez

- Residente em Nutrição do programa de residência em Nutrição do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) - E-mail: manuella.perez@ufpe.br

Judith Advíncula Rocha

- Graduanda em Enfermagem pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – E-mail: judithadvincula@yahoo.com.br

Ricardo Braz Ferreira da Silva

- Graduando em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – E-mail:
ricardobfs@yahoo.com.br

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

- Profª Adjunta do Deptº de Medicina Tropical – Laboratório de imunopatologia Keizo-
Asami, Setor de Microbiologia Clínica – Ageu Magalhães – Universidade Federal de
Pernambuco – UFPE – E-mail: ccastro@lika.ufpe.br

Resumo

Objetivo: Analisou-se o impacto da desnutrição neonatal **DN** e do treinamento físico moderado **TFM** na microbiota oral **MO** de 36 ratos Wistar machos adultos, com idade de 60 dias. **Métodos:** Quanto à dieta, os animais foram divididos em nutridos **N** (caseína 17%) e desnutridos **D** (caseína 8%). Quanto ao **TFM**, em treino **T**, controle treino **CT** e normativo **Nm**, formando os subgrupos **NT= 6**, **NCT= 6**, **NNm= 6** e seus correspondentes desnutridos. Os **NT** e **DT** foram submetidos a um **TFM** em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas). No 1º dia antes do início do treinamento **T0** e 24h após o último **T1**, realizou-se a coleta da **MO**. Utilizou-se swab estéril embebido em 40µL de salina, colocando-o em um tubo contendo 960µL de BHI (Brain Heart infusion). Semeou-se 1µL da solução em placas contendo meio Ágar Sangue e Levine, sendo incubadas posteriormente em estufa bacteriológica à 37°C por 24h, para identificação e contagem do crescimento bacteriano. Utilizou-se o teste t student pareado e não pareado ($p < 0,05$), com dados em média e desvio padrão. **Resultados:** Houve diferença no **NT** em **T1** ($3,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$) em relação a **T0** ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) ($p < 0,05$) e no **DT** ($6,4 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$) em relação ao **NT** ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) ($p < 0,05$) em **T0**. **Conclusão:** O **TFM** e a **DN** reduziram a **MO** dos animais nutridos e desnutridos, entretanto, o padrão bacteriano foi alterado apenas nos desnutridos.

Termos de indexação: Exercício, Desnutrição, Microbiota oral.

Abstract

Objective: The impact of the neonatal malnutrition-**NM** and the moderate physical training-**MPT** was analyzed in the oral microbiota-**OM** of 36 wistar adult male rats, with age of sixty days. **Methods:** The diet was divided in nurtured **N** (casein 17%) and undernourished **U** (casein 8%). About **MPT**, the division was in training-**T**, training control-**TC** and normative-**Nm**. The groups was subdivided in **TN** = 6, **TCN** = 6, **NmN** = 6 and corresponding ones undernourished. **TN** and **TU** were submitted to **MPT** in rolling wake (60min. /day, 5 days/week, for 8 weeks). The **OM** was realized at 1st day before the training beginning-**T0** and 24:00 after the last-**T1**. Sterile swab was used soaked in 40µL of saline in a tube contending 960µL of Brain Heart infusion. 1µL of the solution was sowed in plates contending Blood Agar and Levine, incubated later in bacteriological stove at 37°C for 24:00 for identification and bacterial growth count. The paired and non paired t test was used ($p < 0.05$) and expresses data was mean \pm **SDM**. **Results:** There was significant difference on **TN** between **T1** ($3,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$) in relation to **T0** ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) ($p < 0.05$). The same with **TU** ($6,4 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$) in relation to **TN** ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) ($p < 0.05$) in **T0**. **Conclusion:** **MPT** and **NM** reduced animal's **OM** nurtured and undernourished. However, the bacterial pattern was just altered in the undernourished.

Indexation terms: Exercise, Malnutrition, Microbiota oral.

INTRODUÇÃO

Populações microbianas são imprescindíveis para a prevenção do hospedeiro contra o crescimento excessivo de patógenos¹ constituindo a microbiota normal. Esta refere-se à população de microrganismos que residem no interior ou na superfície corporal da pele e das mucosas normais e sadias². Os microrganismos se estabelecem no corpo podendo viver sem causar doenças³. Os animais incluindo os seres humanos, geralmente são livres de microrganismos intra-uterino³. Contudo, no momento do parto, populações microbianas começam a se estabelecer¹.

A cavidade oral *in útero* é estéril, mas poucas horas após o nascimento, desenvolve-se uma microbiota oral simples⁴. Essa pode variar com a idade, hábitos alimentares, estado nutricional, fluxo salivar e condições imunológicas. Na fase adulta, a microbiota oral torna-se altamente complexa, composta por cerca de 500 grupos bacterianos⁵, os quais localizam-se principalmente no dorso da língua, sulco gengival e na placa dental⁵. Estima-se que a saliva contenha cerca de 10^8 bactérias/mL e as placas dentais, 10^{11} bactérias/mL⁶.

Alguns microrganismos da microbiota normal podem se transformar em patógenos oportunistas. Esses podem causar infecção seja por uma imunossupressão do hospedeiro ou por sua instalação em outros sítios corpóreos⁷. Entretanto, em indivíduos saudáveis, algumas espécies de bactérias da microbiota oral podem causar cáries em até 80% da população⁸. Esses eventos podem ser desencadeados por alterações na umidade, temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes da cavidade oral⁴.

A estrutura anatômica da cavidade oral de humanos apresenta diferenças em alguns aspectos quanto ao de roedores. Contudo, em relação à microbiota oral normal, tem uma composição semelhante^{5,6}. As bactérias com maior predominância

na microbiota normal oral de ratos foram os *Lactobacillus murinus*, os *Streptococcus spp*, os *Enterococcus faecalis* e os *Staphylococcus spp*⁹. Na mucosa, foi encontrado em altas proporções o *L. murinus*, já nos dentes o *E. faecalis*, o qual se deve ao hábito de coprofagia dos ratos⁹. O acúmulo de algumas bactérias nessa região, podem desencadear um estado infeccioso, estimulando o sistema imune a uma resposta inflamatória.

A forma e a frequência de alimentos consumidos têm um efeito direto sobre o ambiente microbiano oral. Tais aspectos são importantes no desenvolvimento dental, na integridade dos tecidos gengivais e orais, prevenção e tratamento das doenças da cavidade oral¹⁰. Uma dieta inapropriada, carente em nutrientes importantes como a desnutrição, pode causar um desequilíbrio na microbiota normal oral. A desnutrição é um estado mórbido secundário à deficiência de um ou mais nutrientes essenciais¹¹.

A desnutrição é apontada como uma das principais causas de deficiência secundária na resposta do organismo aos agentes infecciosos¹². Essa quando ocorrida no período neonatal, pode causar conseqüências severas no sistema imunológico. Mesmo após recuperação nutricional, os mecanismos imunitários podem estar comprometidos¹². Os nutrientes parecem influenciar diretamente nos componentes do sistema imune. Porém, outros fatores podem interagir com esse sistema, dentre estes, destaca-se o papel do exercício físico¹³.

O exercício físico regular a depender de sua magnitude, parece alterar a resposta imunológica¹⁴. Esta influência pode ser benéfica ou deletéria, dependendo da intensidade, da frequência e da duração do esforço¹⁵. O estudo das relações entre o exercício físico, desnutrição e microbiota oral de ratos é escasso e os poucos resultados ainda são conflitantes. A avaliação desses aspectos no campo experimental e clínico é relevante, logo, o presente estudo analisou o impacto da desnutrição

neonatal e posteriormente do treinamento físico moderado sobre a microbiota oral normal de ratos adultos.

MÉTODOS

Foram utilizados 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. O biotério é mantido uma temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo invertido de 12 horas (claro – 21h00 às 09h00; escuro – 09h00 às 21h00). Os animais são criados em gaiolas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*.

Os animais adultos que originaram as amostras foram encaminhados ao biotério experimental com ciclo invertido (claro: 20h00 as 08h00 e escuro: 08h00 as 20h00), onde, antes de iniciar a cópula, passaram por um período de 15 (quinze) dias de adaptação ao novo ambiente. O acasalamento foi feito numa proporção de um macho para duas fêmeas. A prenhes foi observada pelo aumento do ventre das fêmeas, as quais foram colocadas em gaiolas individuais até o parto. Considerou-se o primeiro dia pós-parto como o início do aleitamento, onde os grupos foram compostos por seis filhotes machos por mãe.

Durante a amamentação, as mães foram submetidas a uma dieta hipoprotéica (caseína 8%) ou normoprotéica (caseína 17%), compondo os grupos desnutridos (n=18) e nutridos (n=18). Os filhotes receberam a dieta de forma indireta, a partir do leite materno. No vigésimo segundo dia (desmame), as mães foram submetidas a ortanásia e todos os filhotes passaram a consumir labina, adotada como dieta padrão no biotério, contendo 23% de proteínas mistas até o final do experimento (120º dia).

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal (CEEAA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e

seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Ofício nº 76/07 de 14 de Agosto de 2007, processo nº 008226/2007-55.

Treinamento físico moderado e dieta

Aos sessenta dias de vida, os animais foram divididos de acordo com o treinamento físico moderado e da manipulação da dieta¹⁶. Quanto ao treino, em treinados e não treinados; quanto à dieta, em nutridos e desnutridos. Em seguida, subdivididos em nutridos treino (n=6), controle treino (n=6) e normativo (n=6) e seus correspondentes desnutridos. Os grupos nutrido e desnutrido treino, foram submetidos a um protocolo de treinamento físico moderado em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas)¹⁷.

Microbiota Oral

Coleta de material para cultura

Antes de iniciar o primeiro treino (T0), foi realizada a coleta de material da cavidade oral dos ratos. Cada animal era segurado na posição vertical, de modo que suas patas fossem imobilizadas. Em seguida, realizou-se a coleta da microbiota dos ratos através de swabs estéreis, embebidos em 40µL de solução salina de NaCl 0,9%. Este procedimento foi repetido após a realização do último treino (T1).

Bacterioscopia, semeio, isolamento, e identificação bacteriana.

Após cada coleta, os swabs eram colocados em tubos estéreis contendo 960µL de meio BHI (Brain Heart Infusion), meio líquido de enriquecimento que permite o crescimento bacteriano. Através de uma alça de platina calibrada de 1µL, retirou-se uma alíquota da amostra previamente homogeneizada e foram confeccionadas lâminas para a coloração de Gram. Em seguida, outra alíquota foi retirada da amostra e semeada em placas de Petri contendo os meios de cultura Ágar-sangue e Ágar-Levine, para o isolamento e identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As placas

eram incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C por 24h para crescimento de bactérias aeróbias. As unidades formadoras de colônias (UFC) que cresceram, foram contadas e as bactérias identificadas através de testes específicos.

Identificação de *Staphylococcus aureus*

Os cocos Gram-positivos quando visualizados em forma de cachos pela coloração do Gram, realizava-se o procedimento de diferenciar o *S. aureus* dos outros tipos de *Staphylococcus*. Foi usado um teste de aglutinação em látex (Staphclin) da Laborclin. Deixavam-se os reagentes adquirirem a temperatura ambiente e então numa lâmina limpa e desengordurada, colocava-se uma gota de salina e emulsionava duas a quatro colônias suspeitas com auxílio de um palito de madeira. Homogeneizava o Staphclin látex e adicionava uma gota na suspensão homogeneizando-se o conteúdo da lâmina, agitando-se a lâmina em movimentos rotatórios e fazendo-se a leitura do resultado. Suspensão límpida com grumos grandes, teste positivo para *S. aureus*, ausência de grumos teste negativo.

O Staphclin teste ao dar negativo, era realizado o teste de sensibilidade a novobiocina. Fazia-se uma suspensão de 0,5 na escala de MacFarland em meio BHI e com o auxílio de um swab, fazia-se o semeio em Ágar sangue e colocava-se o disco de novobiocina. A placa era deixada na estufa por 18-24h e em seguida o resultado era lido. As bactérias sensíveis a novobiocina são chamadas de *Staphylococcus coagulase negativa*, já as resistentes, são chamadas de *Staphylococcus saprophyticus*.

Identificação de *Streptococcus*

Através da visualização de cocos Gram-positivos em forma de cadeia na coloração de Gram realizava-se a identificação dos *Streptococcus*. Como todas as colônias de *Streptococcus* isolados apresentaram α -hemólise, os testes realizados foram os de sensibilidade a optoquina, prova da bile esculina e NaCl a 6,5%. Para o

teste da optoquina, fazia-se uma suspensão bacteriana de 0,5 de MacFarland em meio BHI e com o auxílio de um Swab, fazia-se o semeio no Agar sangue e colocava-se o disco da optoquina. Em paralelo fazia-se semeio em estrias na superfície de um tubo contendo meio inclinado de Ágar bile esculina e fazia-se uma suspensão em meio líquido contendo NaCl a 6,5%. Em seguida, os meios e o tubo de NaCl foram colocados em estufa pelo período de 24-48h.

A bactéria sensível a optoquina era o *Streptococcus pneumoniae*. Quando a bactéria era resistente a optoquina, possuía o semeio no tubo com bile esculina positivo (verificado pela formação de uma cor enegrecida na superfície do tubo) e havendo turvação do tubo contendo NaCl a 6,5%, era identificada como *Enterococcus sp*, caso o resultado fosse o mesmo, apenas o NaCl dando negativo, essa bactéria era identificada como sendo *Streptococcus do grupo D*. Já para o *Streptococcus do grupo viridans*, havia resistência a optoquina e resultados para bile esculina e NaCl a 6,5% negativos.

Identificação de *Bacillus sp* e *Corynebacterium sp*

Era feita única e exclusivamente pela coloração de Gram. Bacilos Gram positivos com esporos eram identificados como sendo *Bacillus sp*, enquanto que Bacilos Gram positivos, em forma de letras chinesas, como *Corynebacterium sp*.

Identificação de bacilos Gram negativos

Para a identificação dos bacilos Gram negativos, usou-se o kit para enterobactérias da Laborclin. Este Kit era composto por cinco tubos de vidro com tampas de rosca, contendo meios de culturas específicos. O primeiro tubo com meio de Rugai sem sacarose, sólido e inclinado; O segundo, com meio LMI – Lisina, Motilidade e Indol semi-sólido; O terceiro, com meio MIO – Motilidade, Indol e Ornitina semi-sólido; O quarto, com meio de Rhamnose líquido seguido da adição de vaselina estéril e o quinto, continha meio de citrato, sólido e inclinado. A identificação da bactéria era

feita observando as mudanças de cor nos meios, pelos indicadores de pH presentes nos mesmos. Essa leitura era realizada através de uma numeração específica, por meio de uma tabela normativa.

Análise estatística

Para análise descritiva utilizou-se a distribuição de probabilidade. Nas comparações intra e entre grupos, utilizou-se o teste t Student pareado e não pareado, com um nível de significância estatística de $p < 0,05$. Os dados foram representados em média e desvio padrão.

RESULTADOS

Quantificação de bactérias aeróbias da microbiota normal oral

As bactérias isoladas foram identificadas e classificadas de acordo com sua prevalência na microbiota oral, tanto de ratos nutridos quanto os desnutridos. O *Streptococcus do grupo viridans* teve maior ocorrência (21,1%) e o *Streptococcus pneumoniae* e a *Escherichia coli*, menor (1,4%) cada (tabela 1).

Tabela 1

Prevalência de bactérias por Gram

A prevalência, em valores absolutos de bactérias Gram⁺ na microbiota oral de ratos que consumiram caseína 17% e 8% (150;130), foi maior do que a prevalência das bactérias Gram⁻ (2;2).

Prevalência de bactérias no grupo nutrido

No grupo nutrido, a bactéria com maior número de ocorrência foi o *Streptococcus grupo viridans*, incidindo nos três grupos estudados: treino (14), controle treino (10) e

normativo (10). Já as de menor prevalência foram a *Escherichia coli*, a *Corynebacterium sp* e o *Enterococcus sp*, nos grupos treino (1), controle treino (5) e normativo (2) (figura 2).

Figura 2

Prevalência de bactérias no grupo desnutrido

No grupo desnutrido, as bactérias com maior número de ocorrência foram o *Streptococcus grupo viridans* nos grupos treino (11) e no controle treino (10) e o *Staphylococcus saprophyticus* no grupo normativo (11). Já as de menor prevalência foram o *Streptococcus pneumoniae* no grupo treino (2), o *Staphylococcus saprophyticus* no controle treino (1) e o *Staphylococcus aureus* no normativo (4) (figura 3).

Figura 3

Comparação nos grupos treino nutrido e desnutrido, em relação a quantidade de bactérias encontradas na microbiota normal oral.

Ao compararmos o grupo nutrido treinado nos tempos “T0 e T1”, observou-se uma redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de bactérias da microbiota oral de ratos no tempo T1 ($3,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$) em relação a T0 ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) (teste t student pareado / dados em média \pm desvio padrão) (figura 4).

Figura 4

Ao compararmos o grupo desnutrido treinado no tempo T1 ($4,5 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$) em relação a T0 ($6,4 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$), observou-se uma redução na quantidade de bactérias da microbiota oral, entretanto, não o suficiente para obtenção de diferença significativa entre os tempos no grupo (teste t student / dados em média \pm desvio padrão).

Comparação dos grupos treino nutrido e desnutrido, em relação a quantidade de bactérias encontradas na microbiota normal oral.

Ao compararmos os grupos treino nutrido ($15 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^6$) com desnutrido treino ($6,4 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$) em T0, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de bactérias da microbiota normal oral de ratos (teste t student / dados em média \pm desvio padrão) (figura 5).

Figura 5

Ao compararmos os grupos treino nutrido ($3,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$) com o desnutrido treino ($4,5 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^6$) em T1, não foi observado diferença estatística em relação a quantidade de bactérias da microbiota normal oral de ratos (teste t student / dados em média \pm desvio padrão).

DISCUSSÃO

A microbiota oral normal é de suma importância para o organismo. Dificulta a entrada de microrganismos invasores, produzindo secreções antagônicas para outras bactérias patogênicas¹⁸.

No presente trabalho identificou-se nove tipos bacterianos tanto nos animais nutridos quanto nos desnutridos. A bactéria em maior quantidade e mais freqüente foi o *Streptococcus do grupo viridans*, enquanto as de menor quantidade e menor freqüência

foram o *Streptococcus pneumoniae* e a *Escherichia coli*. Estudo realizado com a microbiota oral normal de ratos, identificou as bactérias *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteróides*, *Fusobacterium*, *Spirochetes*, e *Protozoa*¹⁹.

Nossos resultados foram semelhantes aos encontrados na microbiota oral normal de ratos adultos, desnutridos ou não no período neonatal e submetidos a um programa de treinamento físico moderado de natação. Identificou-se o *Bacillus sp* e o *Streptococcus do grupo viridans*, como as bactérias mais freqüentes e o *Enterococcus* como a de menor freqüência²⁰. Em outro estudo, as bactérias predominantes e mais freqüentes foram *Lactobacillus murinus*, *Streptococcus spp*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus*⁹.

Este trabalho identificou em relação à coloração de Gram, aproximadamente 98% de bactérias Gram⁺ e 2% Gram⁻. O resultado concorda com outro achado, no qual o Gram⁺ correspondia a 91,8% e o Gram⁻ a 8,2%²¹. Variáveis intervenientes como o exercício físico e a desnutrição não foram consideradas nesse trabalho. Pesquisa realizada com ratos, desnutridos no período neonatal e submetidos a um programa de treinamento físico moderado de natação, identificou 70% de bactérias Gram⁺ e 30% de Gram⁻²⁰. O tipo de treinamento pode ter influenciado no resultado. Em outro estudo experimental com ratos, 80% das bactérias aeróbias e anaeróbias isoladas, eram Gram⁺⁶.

No presente estudo, observou-se no grupo nutrido, o *Streptococcus do grupo viridans* como a bactéria de maior prevalência no grupo treino (GT), controle treino (CT) e normativo (N), enquanto que a *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp* e o *Enterococcus* as de menor prevalência. No grupo desnutrido, o *Streptococcus do grupo*

viridans foi mais prevalente nos GT e CT e o *Staphylococcus saprophyticus* no N, enquanto as de menor prevalência foram o *Streptococcus pneumoniae* no GT, o *Staphylococcus saprophyticus* no CT e o *Staphylococcus aureus* no N.

Em descrição realizada da microbiota normal oral de ratos nutridos submetidos à extração dentária, identificou-se *Bacillus sp* como a bactéria mais freqüente e as *Escherichia coli* e *Serratia liquefaciens* como as menos freqüentes²¹. Na alveolite, as mais freqüentes foram *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus do grupo viridans* e as menos freqüentes *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia sp*. Estes achados sugerem que as bactérias identificadas não diferem muito das encontradas no presente trabalho, mesmo sob a influência de diferentes variáveis como extração, alveolite, desnutrição e o exercício físico moderado.

O treinamento físico moderado parece estar associado a uma melhora de muitas funções do sistema imune inato e adaptativo²². No presente trabalho, verificou-se uma redução significativa da quantidade de bactérias da microbiota normal oral de ratos do grupo nutrido (caseína-17%) no tempo T1 em relação a T0. Em experimento realizado com ratos nutridos (caseína-17%), submetidos a um treinamento físico moderado de natação, não foi observado diferença estatística no T1 em relação à T0²⁰. As diferenças encontradas sugerem que o tipo de treinamento parece ter influenciado na quantidade de bactérias encontradas.

Neste estudo, não foi verificado no grupo desnutrido (caseína 8%) diferença significativa na quantidade de bactérias em T1 em relação a T0, apesar da redução do número de bactérias pós-treinamento. Em trabalho realizado utilizando um protocolo de treinamento físico moderado com natação e o mesmo tipo de dieta, observaram-se resultados semelhantes aos apresentados²⁰. O treinamento físico moderado tanto em

esteira rolante quanto em natação, parece não ter influenciado na quantidade de bactérias da microbiota normal oral de ratos desnutridos.

A desnutrição causa danos a imunidade inespecífica, representada pelas barreiras epiteliais e mucosas, o que aumenta a susceptibilidade às infecções^{12,23}. No presente trabalho, ao comparar o grupo treino nutrido com desnutrido, observou-se diferença significativa em T0, entretanto em T1, não foi observado diferença. Essas encontradas em T0 parecem estar associadas à influência da desnutrição imposta no período neonatal. Entretanto, os achados em T1 fundamentam-se pela influência do treino na redução da quantidade de bactérias da microbiota no nutrido, fazendo com que os valores entre os grupos se equiparassem.

CONCLUSÃO

O treinamento físico moderado e a desnutrição neonatal reduziram o crescimento bacteriano da cavidade oral dos animais dos grupos nutrido e desnutrido, entretanto, o padrão bacteriano foi alterado apenas no desnutrido.

COLABORADORES

M.T. VIANA participou da elaboração das bases experimentais, da tabulação e análises estatísticas e da confecção do manuscrito. D.L.L. FONSECA participou da coleta da microbiota oral dos ratos, da discussão e elaboração do artigo. M.C. PEREZ fundamentou teoricamente as bases em nutrição e suas relações com exercício e microbiota oral. J.A. ROCHA participou da preparação dos grupos experimentais e coleta da microbiota oral dos ratos. R.B. FERREIRA DA SILVA participou na aplicação do protocolo de treinamento físico, organização e manutenção dos grupos experimentais. C.M.M.B. CASTRO participou da discussão dos resultados e sistematização do artigo.

REFERÊNCIAS

MANDELL, G.L. DOUGLAS, R.G., BENETT, J.E., DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. 5 th ed. Philadelphia: Churchill livingstone, 2242,2005

PASTER, B.J. BOCHES, S.K. GALVIN, J.L. ERICSON, R.E. LAU, C.N. LEVANOS, V.A. SAHASRABUDHE, A. DEWHIRST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. Journal of bacteriology, v. 183, p. 3770-3783, 2001.

TORTORA, G.J. FUNKE, B.R., CASE, C.L., Princípios de doença e epidemiologia. In: Microbiologia. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. cap. 14, p. 394-420.

WILKINS, E.M. Odontologia geral: teoria e prática, 1 ed. São Paulo. Rideel, 2004.

GUTIERREZ-PEREZ, J.L. Et al. Infecciones orofaciales de origem odontogênico. Méd. Oral., S.1., v.9, p. 280-287,2004.

KOLLER, M.M. PURUSHOTHAM, K.R. MAEDA, N. SCARPACE, P.J. HUMPHREYS-BEHER, M.G. Desipramine induced changes in salivary proteins, cultivable oral microbiota and gingival health in aging female NIA Fischer 344 rats. Life Sciences, v. 68, p. 445-455, 2000b.

PELCZAR JUNIOR, M.J. CHAN, E.C.S. KRIEG, N.R., Flora Normal do corpo humano. In: Microbiologia Conceitos e Aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books,1996. v. 2. cap. 17, p. 22-40.

VICENTE, E.J. Apostila de aulas práticas. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Disciplina de Microbiologia. 2004

TRUDEL, L. AMAND, L.S. BAREIL, M. CARDINAL, P. LAVOI, M.C. Bacteriology of the oral cavity of the BALB/c mice. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 673-678, 1986.

TOUGER-DECKER, R. Nutrição para a saúde oral e dental. In: MAHAN, L.K. ESCOTT-STUMP, S. Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11th ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 637

MAGNONI, D. CUKIER, C. Perguntas e Respostas em Nutrição Clínica. 1st Ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 7

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nut*, 1997; 66(2): 460S-463S.

CURI, R. *et al.* Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. Vol 284, Issue 6, C1335-C1361, June 2003. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 1355-361.

DRELA, N. Moderate Exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC Geriatr* 2004; 4:8-12.

SOUZA, V.A.I. www1.uol.com.br/cyberdiet/colunas/070521_fit_sistema_imunologico.htm. Acessado em 22/05/2007, 11:30h

REEVES, P.G. NIELSEN, F.H. FAHEY, G.C.J. 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. *Journal of Nutrition*. Urbana, Vol. 123 n. 11, pp. 1939-1951, 1993.

LEANDRO, C. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2002, vol. 2, nº 5 [80-90]

BURTON, G.R.W. ENGELKIRK, P.G. Microbiologia para as Ciências da Saúde. 7th Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 200-2004

ISOGAI, E. *et al.* Microbial ecology of plaque in rats with naturally occurring gingivitis. *Infect. Immun.*, S1, v. 48, p. 520-527, 1985.

PORTO, S.M.M.S. Impacto da desnutrição neonatal e do treinamento físico moderado em mecanismos de defesa de ratos adultos. Tese de Mestrado. 2006.

ARAÚJO, F.R.G. Resposta Bacteriológica e Histológica em Processos de Alveolite em Ratos (*Rattus norvegicus albinus*) Tratados com *Mercurius solubilis*. Tese de Mestrado. 2006.

DAVIS, J.M. KOHUT, M.L. JACKSON, D.A. COLBERT, L.H. MAYER, E.P. GHAFFAR, A. Exercise effects on lung tumor metastases and in vitro alveolar macrophage antitumor cytotoxicity. *Am J Physiol*, 43(5pt2): R1454-R1459. 1998.

MORGAN, G. What, if any, is the effect of malnutrition on immunological competence?. *Lancet*, 349: 1693-1695, 1997.

Tabela nº 1 - Total de bactérias encontradas na microbiota normal oral de ratos nutridos e desnutridos.

Nome das bactérias	Valores	
	Absolutos	Relativos (%)
<i>Streptococcus grupo viridians</i>	60	21,1
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	17,6
<i>Bacillus sp</i>	46	16,2
<i>Corynebacterium sp.</i>	37	13
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	36	12,7
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	30	10,6
<i>Streptococcus pneumonia</i>	04	1,4
<i>Enterococcus sp.</i>	17	06
<i>Escherichia coli</i>	04	1,4

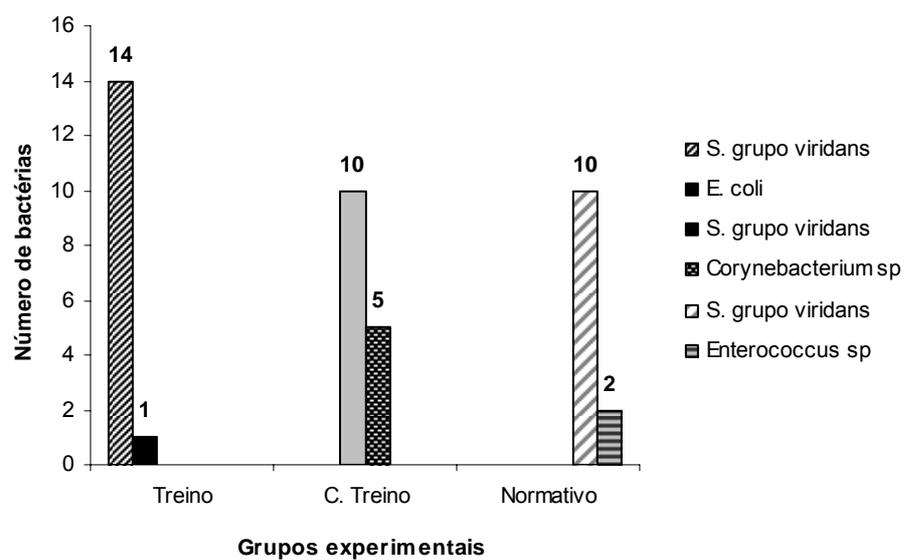


Figura 2 - Bactérias de maior e menor prevalência no grupo nutrido

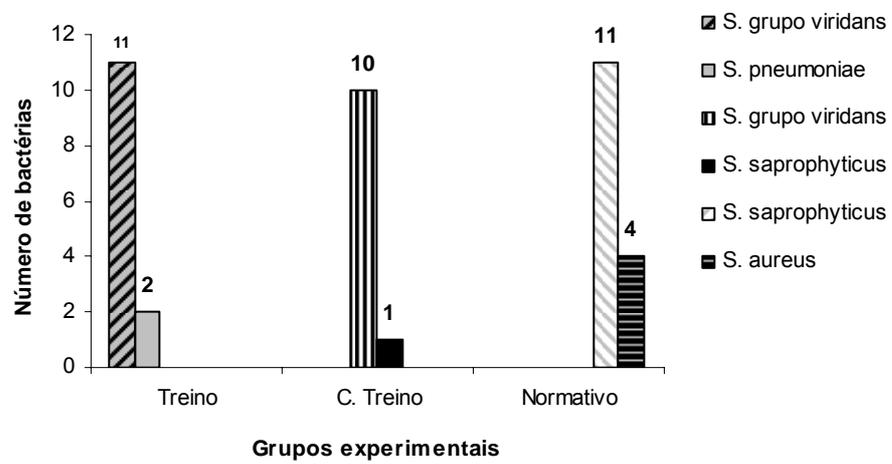


Figura 3 - Bactérias de maior e menor prevalência no grupo desnutrido

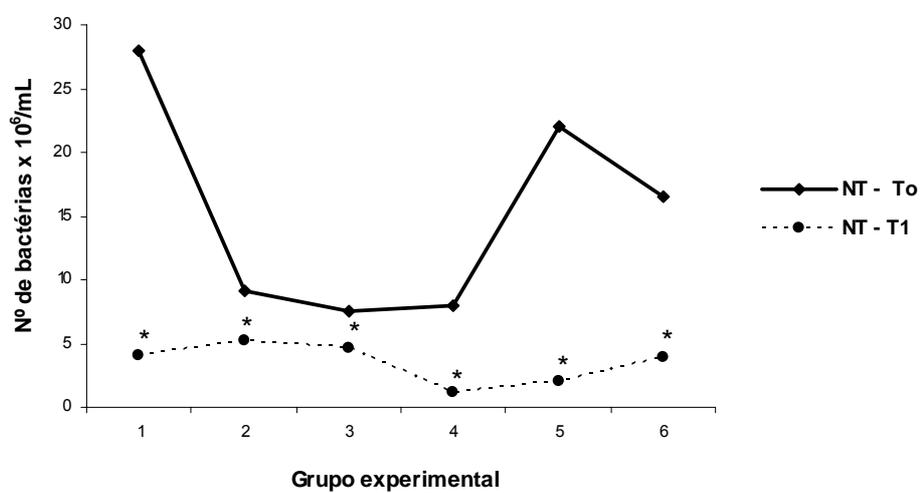


Figura 4 - Influência do exercício físico sobre a microbiota normal oral de ratos nutridos treino (NT) em T1 (tempo final) em relação a T0 (tempo inicial) - teste t student pareado - $p < 0,05^*$, com dados em média \pm desvio padrão -.

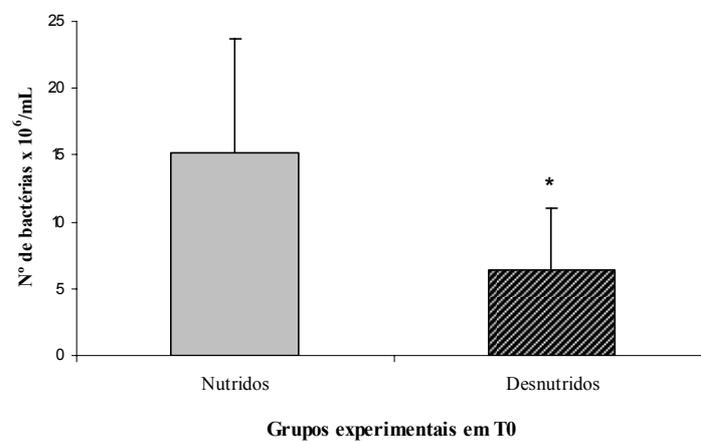


Figura 5 - Influência da desnutrição sobre a microbiota normal oral de ratos nutridos e desnutridos treino em T0 (tempo inicial) - teste t student - $p < 0,05^*$, dados em média \pm desvio padrão -.

ARTIGO II

“Adaptação leucocitária, hematimétrica e morfológica ao treinamento físico moderado de ratos desnutridos precocemente”.

short title: Exercício, desnutrição, Leucócitos

“Leukocyte, hematimetric and morphologic adaptation to the moderated physical training of rats early malnourished”.

short title: Exercise, Malnourished, Leukocytes.

Marcelo Tavares Viana - Autor responsável pelas negociações

- Doutorando em Bases Experimentais da Nutrição – Deptº. de Pós-Graduação em Nutrição / Laboratório de imunopatologia Keizo - Asami, setor de microbiologia clínica - Ageu Magalhães - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE - Bolsista do CNPQ - E-mail: mtviana0@hotmail.com / **Endereço para correspondência:** Rua do Bom Pastor, nº 1635 / Bloco L / Aptº 301 / Condomínio Sonho Dourado / Bairro: Engenho do Meio / Recife - PE – fone: 32729903 / 96789951

Valdenilson Ribeiro Ribas

- Doutorando em Neuropsiquiatria do Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE – E-mail: ribaspsy@ufpe.br

Manuella Cavalcanti Perez

- Residente em Nutrição do Programa de Residência em Nutrição do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) - E-mail: mcperez.ufpe@yahoo.com.br

Soraya dos Santos Silva

- Graduada em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – E-mail: ss.soraya@gmail.com

Fernando José de Sá Pereira Guimarães

- Profº Adjunto da Universidade de Pernambuco – UPE – E-mail: fguima60@hotmail.com / Coordenador do Setor de Avaliação Cinenatropométrica - CENESP - UPE - Pernambuco

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

- Profª Adjunta do Deptº de Medicina Tropical – Laboratório de imunopatologia Keizo-Asami,
Setor de Microbiologia Clínica – Ageu Magalhães – Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE - E-mail: ccastro@lika.ufpe.br

Resumo

Objetivo: Analisou-se o impacto do treinamento físico moderado **TFM** sobre os leucócitos totais **LT**, diferenciais **LD** e série vermelha **SV** de 36 ratos Wistar machos adultos (sessenta dias) desnutridos precocemente **DP** ou não. **Métodos:** Quanto à dieta, foram divididos em nutridos **N** (caseína 17%) e desnutridos **D** (caseína 8%). Quanto ao **TFM**, em treino **T**, controle treino **CT** e normativo **Nm**. Os **NT** e **DT** foram submetidos a um **TFM** em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas). No 1º dia antes do treino **T₀** e 24h após o último dia de cada semana de treino (**T₁** a **T₈**), retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da cauda dos animais para análise sanguínea. Os **LT** foram contados em hemocitômetro com auxílio do microscópio eletrônico. Nos **LD** utilizamos o esfregaço sanguíneo e contabilizamos em contador eletrônico KACIL. Para hemoglobina **Hg**, a solução hipotônica foi lida pela técnica de cianometemoglobina. Os hematócitos **Ht** foram determinados percentualmente por micro-hematócrito e para contagem de hemácias **Hm** por 1mm³, utilizou-se o hemocitômetro. Utilizou-se o teste t student ($p < 0,05$), com dados em média e desvio padrão. **Resultados:** Houve diferença significativa nos **LT** entre os **NT** ($9,1 \pm 0,1$) e **DT** ($8,0 \pm 0,1$) desde **T₁** e em neutrófilos ($22,1 \pm 0,6$), ($24,6 \pm 1,8$) a partir de **T₇** ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística em **Hg**, **Ht** e **Hm** desde **T₁**. **Discussão:** O **TFM** alterou **LT**, **LD** e a **SV** do **DT**. **Conclusão:** O **TFM** parece ter induzido, a partir de **T₁**, adaptação fisiológica nas variáveis citadas em ratos adultos **DP**.

Termos de indexação: exercício, desnutrição, leucócitos

Abstract

Objective: the impact of the moderate physical training **MPT** on leukocytes total **LT** and leukocytes differentiate count **LD** and red series **RS** of 36 Wistar adult male rats with age of sixty days early malnourished **EM**. **Methods:** the diet was divided in nourished **N** (casein 17%) and malnourished **M** (casein 8%). About the **MPT**, the division was in training **T**, training control **TC** and normative **Nm**. The **N** and **M** were submitted to a **MPT** in rolling wake (60min. /day, 5 days/week, for 8 weeks). In the 1st day, before the training start **T₀**, and 24:00 after the last training day of the week (**T₁** until **T₈**), a 0.1 mL aliquot of the animals' tail to the blood analysis. The **LT** was counted in hemocytometer with aid of the electronic microscope. The blood films was used to **LD** and counted with KACIL electronic accountant, with keys corresponding to each cell type. The hypotonic solution was read by the cyanomethemoglobin technique for hemoglobin **Hg**. The hematocrits **Ht** were percentually determined for personal hematocrit-computer and for red blood cell count **Rb** for 1mm³, the hemocytometer was used. The t-test was used ($p < 0.05$) with expresses data in mean and standard deviation. **Results:** there was significant difference in **LT** between the **N** ($9,1 \pm 0,1$) and **M** ($8,0 \pm 0,1$), from **T₁** IN neutrophils ($22,1 \pm 0,6$), ($24,6 \pm 1,8$) from **T₇** ($p < 0,05$). There was not statistical significance in **Hg**, **Ht** and **Rb** from **T₁**. **Discussion:** the **MPT** altered **LT**, **LD** and **RS** of the M. **Conclusion:** the **MPT** seems to have induced physiologic adaptation from **T₁** in the mentioned variables in adult rats **EM**.

Indexation terms: Exercise, malnourished, leukocytes.

INTRODUÇÃO

A desnutrição protéica implica em diversas alterações fisiológicas e metabólicas¹, as quais têm sido relacionadas à depressão do sistema imune. Assim, um suprimento adequado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento em todos os sistemas orgânicos. O estudo da desnutrição protéica em modelos animais tem procurado verificar sua associação à recuperação nutricional e ao exercício físico², quer na fase intra-uterina, neonatal ou de desenvolvimento². Porém o restabelecimento das variáveis metabólicas é lento, entretanto, o exercício físico pode beneficiar a recuperação nutricional¹.

O treinamento físico moderado (**TFM**) pode desencadear diversas adaptações bioquímicas, metabólicas, hormonais e imunes³. A realização do **TFM** pode induzir alterações fisiológicas como a liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e ativação de leucócitos⁴. Favorece ainda a aerobiose, melhorando a cinética do oxigênio promovendo melhor absorção pulmonar, transporte sanguíneo e reabsorção celular⁵. O treinamento físico aeróbio também promove o aumento da taxa metabólica basal ou do dispêndio energético, podendo induzir perdas ponderais⁶.

Poucos estudos utilizando protocolos de treinamento físico analisaram, semanalmente, as respostas induzidas pela associação entre o exercício físico e recuperação nutricional em indivíduos submetidos à desnutrição neonatal. Esse procedimento caracterizou a influência desses fatores sobre as variáveis estudadas em cada fase experimental, elucidando detalhadamente suas associações. Desta forma, analisou-se a influência do **TFM** sobre a adaptação leucocitária, hematimétrica e morfológica de ratos desnutridos precocemente e submetidos, posteriormente, à recuperação nutricional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. O biotério central é mantido a uma temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo invertido de 12 horas (claro – 21h00 às 09h00; escuro – 09h01 às 20h59). Nesse biotério, os animais são criados em gaiolas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*. Os animais adultos que originaram as amostras foram encaminhados ao biotério experimental com ciclo invertido (claro: 20h00 as 08h00 e escuro: 08h01 as 19h59), onde, antes de iniciar a cópula, passaram por um período de 15 (quinze) dias de adaptação ao novo ambiente.

O acasalamento foi feito numa proporção de um macho para duas fêmeas. A prenhez foi observada pelo aumento do ventre das fêmeas, as quais foram colocadas em gaiolas individuais até o parto. Considerou-se o primeiro dia pós-parto como o início do aleitamento, onde os grupos foram compostos por seis filhotes machos por mãe. Estas foram divididas em um grupo desnutrido, com dieta hipoprotéica (caseína 8%) e um nutrido, com normoprotéica (caseína 17%). Os filhotes receberam a dieta de forma indireta, a partir do leite materno.

A partir do vigésimo segundo dia de vida (desmame), as mães foram submetidas a ortanásia e os filhotes divididos em três por gaiola, de acordo com a dieta consumida no período neonatal, passam a consumir labina. Esta é adotada como dieta padrão no biotério central, pois contém 23% de proteínas mistas. Essa dieta foi administrada até o final do experimento pelos grupos (120º dia). O peso corporal total **PCT** dos animais foi aferido do primeiro dia de vida até o final do período do experimento, divididos em período de aleitamento (21 dias) diariamente; desmame (22º a 59º dia) e treinamento (60º a 120º dia), em dias alternados. Para isso foi utilizado uma balança eletrônica com precisão de 0,1g e capacidade para 4 Kg (Marte, modelo S-2000).

Aos sessenta dias de vida, os animais foram divididos de acordo com o **TFM** e da manipulação da dieta. Quanto ao treino, em treinados ou não; quanto a dieta, em nutridos e desnutridos. Em seguida, subdivididos em nutridos treino (n=6), controle treino (n=6) e normativo (n=6) e seus pares desnutridos. Os grupos treinos foram submetidos a um protocolo de **TFM** em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas⁷ – **T**₁ a **T**₈), enquanto o grupo controle permaneceu em suas gaiolas, as quais foram deslocadas da estante para junto da esteira apenas no momento do treino. Já o normativo, isento do **TFM**, controlou os procedimentos realizados com o grupo controle, mantendo o princípio do experimento.

Análises dos parâmetros leucocitários e hematimétricos

Foram coletadas antes do início do treino T_0 e 24 horas após a última sessão de cada semana de treino (T_1 a T_8), uma pequena alíquota de sangue (1 mL) da cauda dos animais, devidamente anestesiados. Dessa, 0,5 mL para realização dos índices hematimétricos, como a hemoglobina, hematócrito e hemácias e 0,5 mL para o leucograma, como contagem total e diferencial de leucócitos. O sangue extraído foi depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido de uma gota (20 μ l) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA.

Para determinação da hemoglobina utilizou-se 10 μ L de sangue diluído em 5mL de solução hipotônica “técnica de cianometemoglobina”. Para tal, obteve-se a extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos e formação do produto colorido cianometemoglobina, a partir da reação da hemoglobina com cianetos. A concentração foi inferida por espectrofotometria (Beckman DU-62) com filtro de 540 nm, expressa em mg/dl através da fórmula: $Hb = DO \text{ da amostra} \times FC$, onde: Hb = concentração de hemoglobina, DO = densidade óptica e FC = factor de conversão.

Os valores de hematócrito foram determinados em percentagem pela técnica de micro-hematócrito em leitor de microcapilar por centrifugação (International Microcapillary Reader. IEC). Para a contagem de hemácias por 1mm^3 de sangue foi utilizada solução tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M com $\text{pH}=7.4$ na proporção de 1:200 em hemocítômetro. Para o cálculo foi utilizada a fórmula: $Hm \times 5 \times 200 \times 10$, onde: Hm = número total de hemácias contadas (em $1/5$ de mm^2); 5 = factor de conversão para 1mm^2 ; 200 = factor de conversão da diluição utilizada; 10 = factor de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina). O resultado foi obtido em número de células/ml de sangue. Para a contagem total de leucócitos as amostras de sangue foram diluídas (1:200) em solução de TURK (ácido acético a 3%)⁸.

Os leucócitos foram contados em hemocítômetro com auxílio do microscópio óptico, sendo o resultado obtido pela expressão: $\text{Leucócitos} \times \text{mm}^3 \text{ de sangue} = (Lc. \times 20 \times 10)/4$, onde: Lc = número total de leucócitos contados em 4mm^2 ; 4 = factor de conversão para 1mm^3 ; 20 = factor de conversão da diluição utilizada; 10 = factor de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina). Na contagem diferencial de leucócitos utilizou-se a técnica do esfregaço sanguíneo e para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador electrónico KACIL com teclas correspondentes a cada tipo de célula.

As interveniências da **DN** e do **TFM** sobre as variáveis do estudo fundamentaram-se pela avaliação semanal do protocolo de **TFM**. Este caracterizado

em antes do início do protocolo de treino ou referência basal (**T₀**); na 1ª semana de treino ou quebra da homeostase (**T₁**); da 2ª a 3ª ou período de transição entre a quebra da homeostase e a estabilização do **TFM** (**T₂** a **T₃**) e da 4ª a 8ª semana ou início do período de adaptação (**T₄** a **T₈**). Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco sob o ofício nº 76/07 do processo nº 008226/2007-55 e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

Análise estatística

Para a análise da distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados, utilizou-se os testes ShapiroWillks e Bartlet. Foi confirmado a utilização do teste paramétrico t de *Student* para análise intra e entre os grupos, com dados expressos em média e desvio padrão, com $p < 0,05$. Antes da realização das possíveis comparações entre os grupos experimentais, realizou-se a checagem entre os grupos normativos e controles dos animais **N** e **D** a fim de manter o controle do experimento. Não foi identificada diferença significativa entre as variáveis estudadas nos grupos citados, logo, para todas as comparações possíveis, utilizaram-se os grupos nutrido controle **GNC** e treino **GNT** e desnutrido controle **GDC** e treino **GDT**.

RESULTADOS

Peso corporal

O peso corporal total **PCT** dos animais dos grupos nutrido **GN** e desnutrido **GD** foi mensurado durante todo o seu período de vida, compreendendo os intervalos do 1º ao 21º dia (período de amamentação), 22º ao 59º (período de recuperação nutricional - **RN**) e do 60º a 120º dia de vida (**RN** aliada ao período do **TFM**). Os animais do **GD** apresentaram um menor ganho de **PCT** em relação ao **GN** a partir do 7º até 120º dia de vida ($p < 0,05$) (figura 1).

Figura 1

O **PCT** dos animais dos grupos treino e controle dos **GN** e **GD**, foram mensurados durante as 8 semanas de aplicação **TFM**. Inicialmente, realizamos as comparações semanais (**T₀** a **T₈**) intra-grupos **GNT** ($326,99 \pm 35,42$) e **GNC** ($323,07 \pm 36,79$); **GDT** ($268,84 \pm 20,80$) e **GDC** ($264,16 \pm 19,02$) e observamos que não houve

diferença estatística entre os mesmos ($p < 0,05$). Esses resultados são as médias e desvios gerais obtidos ao final do treinamento, logo, dos quatro grupos analisados, passamos a ter dois, o **GNT** e o **GDT**. Ao compararmos esses grupos, verificamos um menor ganho de **PCT** do **GDT** ($211,03 \pm 10,71$) em relação ao **GNT** ($272,16 \pm 31,70$) ($p < 0,05$), a partir da 1ª semana de treino **T₁** (figura 2).

Figura 2

Contagem de leucócitos totais

A tabela 1 representa a contagem de leucócitos totais **CLT** do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os **GN** e **GD**, durante 8 semanas de **TFM**. Na comparação entre os **GD** em relação ao **GN**, houve uma diferença significativa em **T₀** (efeito da desnutrição) e no **GDT** em relação ao **GNT** a partir de **T₁** (efeito do treino no **GNT**) ($p < 0,05$). Foi observado um aumento significativo na **CLT** no grupo **GDT** em relação ao **GDC** a partir da 2ª semana de treino **T₂** ($p < 0,05$). Entretanto, o aumento significativo do **GNT** em relação ao **GNC** ocorreu a partir de **T₄** ($P < 0,05$).

Tabela 1

Leucócitos diferenciais

A tabela 2 representa a contagem de leucócitos diferenciais **CLD** do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os **GN** e **GD**, durante 8 semanas de **TFM**. Não foi observada diferença significativa nos linfócitos do **DN** em relação ao **GN** em **T₀** (efeito da recuperação nutricional - **RN**) e no **GDT** em relação ao **GNT** a partir de **T₁** (efeito do treino no **GDT**). Entretanto, foi observado um aumento significativo no grupo **GDT** em relação ao **GDC** a partir da 4ª semana de treino **T₄** ($p < 0,05$), já no **GNT** em relação ao **GNC** a partir de **T₅** ($p < 0,05$).

Nos neutrófilos, não foi observada diferença significativa no **GD** em relação ao **GN** em **T₀** (efeito da **RN**) e nos grupos treinos da **T₁** a **T₆**, (efeito do treino no **GDT**) e em **T₇** e **T₈** houve um aumento significativo no **GDT** em relação ao **GNT** ($p < 0,05$). Já nos treinos em relação aos controles, houve um aumento significativo a partir da **T₃**

($p < 0,05$). Quanto aos monócitos, não houve diferença significativa entre o **GD** e **GN** em **T₀** (efeito da **RN**) e no **GDT** em relação ao **GNT** a partir de **T₁** (efeito do treino). Já os treinados em relação aos controles, houve aumento significativo no **GDT** a partir da **T₄** e no **GNT** a partir de **T₅** ($p < 0,05$). Os eosinófilos não foram responsivos a **RN** e ao **TFM**, apesar de aumentos discretos em seus valores, não houve diferença significativa intra e entre os grupos analisados durante o **TFM**.

Tabela 2

Índices hematimétricos

A tabela 3 representa os índices hematimétricos do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os **GN** e **GD**, durante 8 semanas de **TFM**. Nos Hematócritos, não houve diferença significativa no **GD** em relação ao **GN** em **T₀** (efeito da **RN**) e no **GDT** em relação ao **GNT** a partir de **T₁** (efeito do treino no **GDT**). Foi observado um aumento significativo no **GNT** em relação ao **GNC** a partir da **T₂** ($p < 0,05$), entretanto o aumento significativo do **GDT** em relação ao **GDC** ocorreu em **T₈** ($P < 0,05$).

Na hemoglobina, houve diferença estatística entre o **GD** e o **GN** em **T₀** (efeito da desnutrição) e no **GDT** em relação ao **GNT** em **T₁** (efeito do início do treino nos grupos - quebra da homeostase) ($p < 0,05$). Entretanto, essa diferença não foi significativa a partir da **T₂** (efeito do treino no **GDT**). Foi observado o aumento significativo no **GNT** em relação ao **GNC** em **T₁** (efeito do início do treino - quebra da homeostase) e a partir da **T₅** ($p < 0,05$), já no **GDT** em relação **GDC** a partir de **T₄** ($p < 0,05$).

Nas hemácias, houve diferença estatística no **GD** em relação ao **GN** em **T₀** ($p < 0,05$) (efeito da desnutrição). Nos grupos treinados, houve diferença significativa em **T₁** ($p < 0,05$) (efeito do início do treino - quebra da homeostase). Todavia, essa diferença não foi observada de **T₂** a **T₈** (efeito do treino no **GDT**). No **GNT** em relação ao seu controle, o aumento significativo ocorreu a partir da **T₅** ($p < 0,05$), já no **GDT** em relação ao **GDC**, a partir de **T₄** ($p < 0,05$).

Tabela 3

DISCUSSÃO

Analisaram-se as adaptações fisiológicas induzidas pelo **TFM** nas séries branca e vermelha do sangue periférico e na morfologia (**PCT**) de ratos machos adultos desnutridos precocemente. Avaliou-se na série branca os leucócitos totais **LT** e diferenciais **LD** (neutrófilos **PMN-N**, linfócitos **L**, eosinófilos **E** e monócitos **MNN-M**) e na vermelha os hematócritos **Ht**, as hemoglobinas **Hg** e as hemácias **Hm**. Para identificar a influência do **TFM** e da **DN** sobre as variáveis, comparamos cada semana de treinamento (**T₁** a **T₈**) com o tempo zero (**T₀**), intra e entre os grupos experimentais.

Antes do início do TFM (**T₀**)

Neste período, a **DN** mesmo seguida de **RN**, provocou a redução do número dos **LT**, **Hg** e **Hm** do **GD** quando comparado ao **GN**, entretanto, não observado diferença significativa nas demais variáveis. É provável que a **RN** não tenha sido eficaz para as variáveis alteradas. Esses resultados podem ser consequência do período em que a desnutrição foi aplicada. Nessa fase, há uma maior demanda de calorias e proteínas necessárias para a função celular e para o fornecimento de energia para o metabolismo neonatal⁹. As alterações celulares impostas pela **DN**, parecem intervir na formação de órgãos linfóides¹⁰, além da expansão e alteração leucocitária na fase adulta¹¹.

Na série vermelha, existe uma relação entre o baixo valor biológico da proteína dietética e do ferro e as alterações de parâmetros hematológicos¹². A **DN** pode alterar a estrutura da **Hm** e da **Hg**, reduzido seu número e função¹². A carência do ferro pode alterar o transporte gasoso, reduzindo o consumo máximo de oxigênio **Vo₂ máx.**, um dos parâmetros de análise do rendimento no **EF**⁵. No **PCT**, a **DN** pode ter alterado o teor protéico do leite da prole¹³, a qual manteve o baixo peso a partir do 7º dia da fase neonatal até o 120º dia da fase adulta.

Nosso trabalho corroborou, em alguns aspectos, com outro estudo que não observou alteração no número de **MNN-M** e **E** do **GD** em relação ao **GN**, entretanto, houve uma redução significativa nos **LT** nesse período e no **PCT** dos animais a partir do 5º dia de vida¹³. Os efeitos da restrição protéica durante o período neonatal, também foram demonstrados em ratos a partir do 5º dia¹⁴. Talvez, as diferenças ocorridas nas outras variáveis, devam-se as especificidades das respostas fisiológicas ao tipo de treino (natação), já que os desenhos experimentais foram semelhantes.

Em outro ensaio, a **D** induziu alterações significativas em ratos dos 21 aos 60 dias de vida¹. Esse resultado, apesar do mesmo eixo de estudo, difere do nosso, já que a **D** foi realizada fora do período neonatal. Isso não exime a eficácia do modelo

aplicado, no entanto, pode dificultar na identificação de algumas respostas celulares que são influenciadas por esse período^{10,11}. Em outro modelo, ratos desnutridos administrados com salina - DS e lipopolissacarídeos - DLPS, não diferiram nas variáveis da série vermelha e branca, entretanto, o **PCT** foi diferente do aleitamento a fase adulta¹⁵.

Nossos resultados diferiram do estudo com endotoxina – LPS no **PN**¹⁵, pois não utilizamos estímulos pró-inflamatórios exógenos durante o período experimental. Os efeitos da **D** no **PN** é caracterizado por induzir alterações na imunocompetência do indivíduo, podendo causar danos às estruturas e funções de sistemas orgânicos como o nervoso, endócrino e imune^{16,17}. A **RN** pode restabelecer essas perdas, mas, o processo é lento¹. Nesse contexto, o **EF** pode contribuir para atenuar as repercussões causadas pela **DN**.

1ª semana de treinamento (T₁)

Nesse período, o **TFM** objetivou a quebra da homeostase orgânica¹⁸ dos animais, os quais em algumas variáveis, responderam com valores acima dos basais, às vezes, mesmo sem significância. Observou-se ainda que a **DN** inibiu significativamente o aumento do número de **LT**, **Hg** e **Hm** do **GDT** em relação ao **GNT**, mesmo com o início do treino. Talvez essas variáveis não sejam responsivas a sessões agudas de **EF** moderado de curta duração (5 minutos)¹⁹, a qual alterou as respostas das outras variáveis, gerando um aumento no número de células sanguíneas²⁰.

O **TFM** na **T₁** desencadeou respostas fisiológicas e metabólicas semelhantes às de um treinamento agudo, apesar da intensidade moderada. Essas alterações induzem ajustes homeostáticos²¹, seja como uma resposta a um estresse físico²² ou a uma pré-disposição de adaptação ao treino. O **EF** sob condições agudas pode alterar a contagem, redistribuição e a capacidade funcional de algumas células¹⁹. Essas condições foram observadas no aumento significativo do número de **LT** circulantes de um **GNT** que realizou **EF** agudo moderado (5 min.) em relação ao leve (5 min.)¹⁹.

O **EF** de curta duração pode ser comparado a uma carga súbita de estresse, podendo induzir também alterações na série vermelha do sangue. Os animais, mas não o homem, são capazes de estocar grande quantidade de eritrócitos no baço e expeli-los na circulação quando o sistema transportador de oxigênio está sob estresse¹². Em nosso trabalho, o **TFM** na **T₁** parece ter induzido uma maior demanda energética ao sistema cardiorespiratório dos grupos treinos, melhorando o **Vo₂ máx.** por meio do aumento do número de **Hm** e **Hg**. Logo, a carência dos nutrientes parece não

ter alterado o processo de acoplamento quimiosmótico da produção de energia aeróbia nas mitocôndrias^{4,12}.

A produção de energia nas mitocôndrias resulta em alterações que parecem estar relacionadas com o aumento do metabolismo durante o **EF**, neste sentido, o **PCT** tem sido utilizado para essa avaliação²³. Durante todo o período do treinamento (**T₁** a **T₈**), foi observada diferença significativa no **PCT** entre os grupos treinos, no entanto, não houve diferença intra-grupos. Esse resultado no **GDT** demonstra que a recuperação nutricional foi eficiente, pois o gasto energético e a fase de catabolismo tornar-se-iam intensificados com a associação do **EF** à deficiência nutricional protéica², induzindo uma maior redução de **PCT**.

Um **TFM** de natação durante 6 semanas, induziu a partir da 5ª, um menor ganho de **PCT** em ratos treinados em relação ao seu controle¹². Apesar de períodos diferentes, os resultados são semelhantes, porém, ressalta-se que trabalhamos durante 8 semanas em esteira rolante e aplicamos **DN** e **RN**. Talvez, tais aspectos metodológicos tenham contribuído para a diferença dos achados nas semanas de treino. Além do mais, nossa especificidade identificou diferenças internas nos grupos **N** e **D**, em comparação a outro estudo semelhante que só realizou análises entre grupos¹³.

2ª e 3ª semanas de treinamento (T₂ e T₃)

Esse período foi caracterizado pela transição entre a quebra da homeostase e a estabilização do treinamento físico, o qual induziu em algumas variáveis responsivas, índices entre **T₀** e **T₁**. A **DN** já não impediu o aumento significativo dos valores dos **LT** e **PMN-N** do **GDT** em relação ao seu controle, e dos **LT** em relação ao **GNT**. Nas outras variáveis do **GDT** foram observados aumentos importantes, mas não significativos intra e entre os grupos analisados. É possível que as respostas ressaltadas tenham ocorrido pela ação do **TFM**, o qual, aliado a **RN**, induziu possíveis adaptações fisiológicas nessas células, ao ponto de minimizar as diferenças esperadas.

Os valores leucocitários dos **GDT** e **GNT** em **T₂** e **T₃** aumentaram progressivamente em relação a **T₀** e **T₁**, sugerindo uma leucocitose fisiológica como respostas ao tipo de estresse²³. Logo, essa resposta parece representar uma tendência adaptativa ao **TFM**. É possível que esse processo tenha ocorrido em nossos grupos treinos, já que no intervalo entre **T₀** e **T₃**, foi obtida uma média de **LT** de 9.340/mm³, valor abaixo do que é preconizado para uma possível leucocitose inflamatória²⁴.

Foi observado um aumento na contagem de linfócitos em um grupo de ratos pós - **TFM** agudo de natação até a exaustão²⁵ e noutro submetido a 8 semanas de **TFM** em esteira rolante¹⁸. Em outro experimento, sessões de exercícios regulares em intensidades submáximas não alteraram a contagem de linfócitos²⁶. Todavia, identificou-se leucocitose e linfocitose em ratos submetidos a 5 e 15 min. de treino agudo e moderado²⁷. Apesar da semelhança, fica difícil comparar nossos resultados com os da literatura, já que analisamos as respostas de cada semana do **TFM** em relação a **T₀**.

O **TFM** parece ter influenciado o aumento do número das variáveis da série vermelha em relação a **DN** no período de **T₂** a **T₃**. Esse possível aporte de oxigênio pode aprimorar o **VO_{2 máx.}**, melhorando a capacidade aeróbia dos treinados. Esses resultados, a princípio, excluíram o **GDT** de prováveis alterações em nutrientes como o ferro, responsável pelo transporte de oxigênio e co-fator de patologias como a anemia²⁷. Embora houvesse a possibilidade de uma redução nas **Hm** com o treino, o que poderia causar uma pseudoanemia dilucional²⁷.

Os **Ht**, **Hg** e **Hm** de ratos Wistar submetidos a um **TFM** de natação durante 6 semanas, não foram alterados estatisticamente⁶. Talvez, o tipo de exercício físico, seu ambiente e a ração administrada no **PN**, tenham corroborado para as diferenças ocorridas em relação ao nosso trabalho. Em outro estudo, utilizando o estresse psicológico de contenção, foi observado o aumento no **Ht** e na **Hg**²⁸. Esses resultados corroboram com o nosso trabalho, mesmo utilizando outro tipo de estresse e condição, já que nossos animais foram submetidos a um estresse físico e crônico, o que diferencia a indução dessas respostas.

Os animais são capazes de reter eritrócitos no baço e expeli-los na circulação quando o sistema transportador de oxigênio está sob estresse²⁸. Esse mecanismo via sistema nervoso simpático (SNS) resulta numa contração da musculatura lisa do baço, diminuindo seu volume²⁸. Logo, um estresse físico crônico, como foi o nosso trabalho, pode ter provocado adaptações no fornecimento de oxigênio, com o possível aumento das concentrações de 2,3 difosfoglicerato nos eritrócitos²⁸. Este composto une-se a subunidade da molécula de **Hg**, reduzindo sua afinidade com o oxigênio, disponibilizando-o para os tecidos.

Da 4ª a 8ª semanas de treinamento (T₄ a T₈)

Esse período foi descrito como o início do período de adaptação fisiológica ao treino. A maioria das variáveis analisadas tendeu a aumentos moderados em seus valores. A **RN** auxiliou a consolidar as repercussões causadas pelo **TFM** no **GDT** em praticamente todas as variáveis do estudo, com exceção dos **E**. Este, apesar das

alterações apresentadas durante todo o período de treino, não foi responsivo ao **TFM**. O fato dos **E** não terem diferido intra e entre grupos, minimizou a ocorrência de estresse oxidativo ou overtraining²⁹. Essas respostas observadas nas variáveis do estudo foram semelhantes no grupo **GNT**.

Em nosso trabalho, a **DN** não alterou de uma forma geral, as respostas leucocitárias, hematimétricas e morfológicas dos animais do grupo desnutrido frente ao **EF** na fase adulta. Esses resultados corroboram com outro ensaio que não observou alterações celulares significativas induzidas pela **DN** em fêmeas adultas, mesmo utilizando a desnutrição no período de gestação e lactação, desmame aos 30 dias e natação como **TFM**³⁰. Pode-se observar que variáveis significativas como o sexo e a dieta hipoprotéica na gestação não influenciaram os resultados.

A influência da **DN** também foi estudada no crescimento muscular e linear de ratos jovens e de crianças em fase de **RN**²⁹. Observou-se que os grupos submetidos a **EF** leves, melhoraram seus índices de crescimento antropométrico²⁹. O organismo em recuperação parece preservar os mecanismos homeostáticos que garantem as adaptações fisiológicas ao **EF**, o qual estimula o crescimento linear²⁹. Nossos resultados em consonância com trabalhos realizados^{30,29}, tendem a sugerir uma possível interação entre a **RN** e o **EF** frente a **DN**.

Os efeitos da **RN** e do **TFM** atenuaram as possíveis repercussões causadas pela **DN** no **GDT** e controle, estabelecendo em algumas situações, valores significativos em relação aos nutridos. O **TFM**, analisado semanalmente intra e entre grupos, parece ter induzido adaptações leucocitárias e hematimétricas do sangue periférico de ratos Wistar machos adultos, desnutridos precocemente, além de atenuar a redução de seu **PCT**. Essa perspectiva de trabalho conduz a um diagnóstico específico da real influência do **EF** entre as variáveis estudadas na área de saúde.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Santhiago, V., Da Silva, A.S.R., Gobatto, C.A., De Mello, M.A.R. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. Revista Brasileira de Medicina do Esporte - Vol.12. Nº 2 – Mar/Abr, 2006.

Papoti, M., Almeida, P.B.L., Prada, F.J.A., Eleno, T.G., Hermini, H.A., Gobatto, C.A., De Mello, M.A.R. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. Motriz, Rio Claro, v.9, n.2, p.97 - 104, mai./ago. 2003.

Lapin, L.P, Prestes,J., Pereira, G.B, Palanch, A.C., Cavaglieri, C.R., Verlengia, R. Respostas metabólicas e hormonais ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Educação Física, Esporte, Lazer e Dança*, v. 2, n. 4, p. 115-124, dez. 2007.

Moraska A, Deak T, Spencer R, Roth D, Fleshner M (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 279: R1321-R1329.

Da Cruz, A.M. Resistência aeróbia e eritropoetina. *Estudos*, Goiânia, v.33, n. 7/8, p. 553-572, Jul./Ago. 2006.

Nascimento, E., Cavalcante, T., Pereira, S., Palmeira, A., Rocha, M.A., Viana, M.T., Manhães-de-Castro, R., De-Castro, C.M.M.B., Duarte, J., Leandro, C.G. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2004, vol. 4, nº 3 [26–33].

Leandro, C. G. Influência do treino de resistência moderado na resposta imunológica de ratos submetidos a contenção aguda. [Tese de Doutorado]. Portugal. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física – Universidade do Porto - 2005

Stibbe W, Weise M, Seidel D (1985). Automated platelet count in thrombocytopenic patients-a comparison of methods. *J Clin Chem Clin Biochem*. 23(7):399-404.

Curi, R., Pithon-Curi, T.C., Schumacher, R.I., Freitas, J.J.S., Lagranha, C., Palanch, A.C. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, June (2003). Issue 6. Vol. 284: 1355-361.

Chandra, R.K., Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 3: 73-76

Cunningham-Rundles, S. McNeeley, D.F., Moon, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1119-1128.

Barone, A., Harper, R.G., Wapnir, R.A., Placental copper transport in the rat. Interaction between copper and iron in maternal protein deficiency. *Placenta*. 19: 113-118, 1998.

Porto, S.M.M.S., Araújo, F.R.G., Melo, J.F. Silva, R.R., Ferreira da Silva, K.M., De Castro, C.M.M.B. Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife, 51(1), p. 59-65, 2006.

Queiros-Santos, A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. [dissertação de Mestrado]. Recife. Univ. Federal de Pernambuco, 2000.

Ferreira e Silva, W.T. Aspectos da resposta inflamatória em ratos adultos endotoxêmicos submetidos à desnutrição no período de aleitamento. [Dissertação de Mesrado]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2002.

Picanço-Diniz, C.W., Borba, J.M.C., Rocha-de-Melo, A.P., Santos-Monteiro, J., Guedes, R.C.A. NADPH-diaphorase Histochemical labeling Patterns in the Hippocampal Neuropil and Visual Cortical Neurons in Weaned Rats Reared During Lactation on Different Litter Sizer. *Nutritional Neuroscience*. 2004; 7(4): 207-16.

Costa Rosa, L.F.P.B., Vaisberg, M.W. Influência do exercício na resposta imune. Ver. Bras. Med. Esporte v.8, n.4 - Jul/ago. 2002.

Dias, R., Frolline, A.B., Prestes, J., Ferreira, C.K.O., Donatto, F.F., Verlengia, R., Palanch, A.C. Cavaglieri, C.R. Efeito do exercício agudo de curta duração em leucócitos circulantes e linfócitos teciduais de ratos. Rev. Bras. Educ. Fís. Esp., São Paulo, v.21, n.3, p.229-43, Jul./Set. 2007.

Green, K.J.; Croaker, S.J., Rowbottom, D.G. Carbohydrate Supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.95, n.1, p.57-63, 2003.

Pereira, B., Souza Jr, T.P. Adaptação e rendimento físico – considerações biológicas e antropológicas. R. Bras. Ci e Mov. 2005; 13 (2): 145-152.

Afonso, M., Souza, C.N., Zagatto, A.M., Luciano, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. Motriz, Rio Claro, v.9, n.2, p. 87-92, Mai/Ago. 2003.

Green, K.J.; Rowbottom, D.G., Mackinnon, L.T. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.92, n.6, p.2390-5, 2002.

Prestes, J., Ferreira, C.K.O., Frollini, A.B., Dias, R., Donatto, F.F., Guereschi, M.G., Palanch, A.C., Perez, S.E.A., Cavaglieri, C.R. Influência do exercício físico agudo realizado até a exaustão sobre o número de leucócitos, linfócitos e citocinas circulantes. *Fitness & Performance Journal*, Rio de Janeiro, v.6, n.1, p.446-51, 2007.

Kim H, Shin S, Kim S, Lim B, Kim Y, Chung J, Kim H, Kim C (2003). Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague-Dawley rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 43: 99-104.

Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L. Exercise and the immune system regulation, integration and adaptation. *Psic. Rev.* 2000; 80 (3): 1055-1081.

Bricks, L.F. Ferro e infecções. Atualização. *Pediat. (S. Paulo)*, 16 (1): 34-43, 1994.

Araújo, C.F., Moraes, M.S., Diniz, A.P.S., Cosendey, A.E. Pseudoanemia dilucional e os atletas olímpicos. *RBAC*, vol. 36(4): 197-200, 2004.

Stewart I e McKenzie D (2002). The human spleen during physiological stress. *Sports Med*. 32 (6): 361-369.

Torun, B., Viteri, F.E. Influence of exercise on linear growth. *Eurp. J. Clin. Nutr.*, 48 (suppl – 1): S186 – S190, 1994.

Szent-Györgyi, A.G. The Early History of the Biochemistry of Muscle Contraction. *J Gen Physiol* 2004; v. 123, n. 6, p. 631-641.

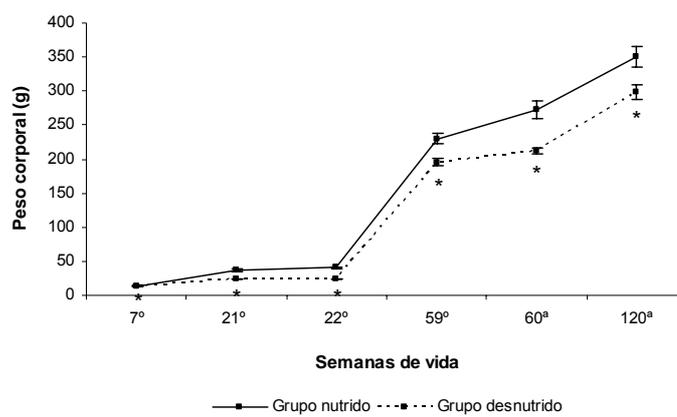


Figura 1 - Menor ganho de peso corporal total dos animais desnutridos em relação aos nutridos a partir do 7º dia até o 120º de vida. Dados em média e desvio padrão - teste t Studente, com $p < 0,05^*$.

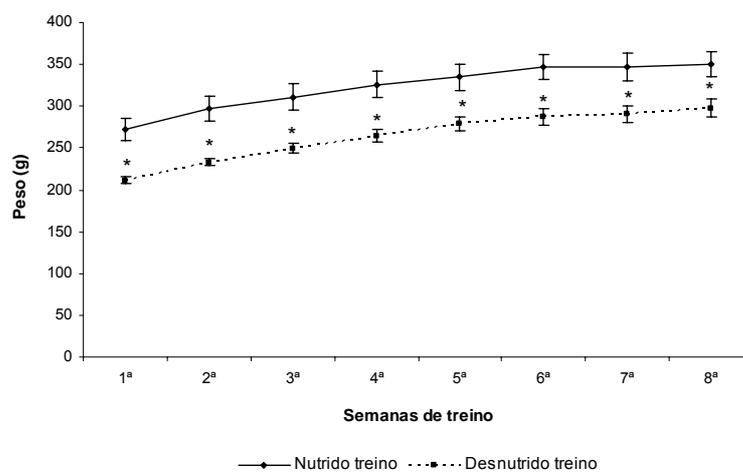


Figura 2 - Menor ganho de peso corporal total dos animais desnutridos treino em relação aos nutridos treinos, durante as 8 semanas de TFM. Dados em média e desvio padrão – teste t Studente, com $p < 0,05^*$.

Tabela 1 – Análise da contagem de leucócitos totais do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os grupos nutrido e desnutrido, durante as 8 semanas de TFM.

Var	Gp	Semanas de treino								
		T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈
Leucócitos totais	NC	7,9 ±0,2	7,8 ±0,2	7,1 ±0,2	7,6 ±0,4	7,3 ±0,4	7,6 ±0,3	8,0 ±0,4	7,9 ±0,2	7,3 ±0,4
	NT	8,0 ±0,2	9,1 ±0,1	7,5 ±0,3	7,4 ±0,3	9,0 ±0,4 ^a	9,7 ±0,1 ^a	10,4±0,2 ^a	10,7±0,2 ^a	10,9±0,1 ^a
	DC	6,6±0,4 ^d	6,3 ±0,4	6,4 ±0,5	6,7 ±0,5	6,7 ±0,4	6,8 ±0,2	6,8 ±0,1	6,9 ±0,1	6,8 ±0,1
	DT	6,7±0,1 ^d	8,0±0,1 ^{b,c}	7,7±0,6 ^{b,c}	7,5±0,4 ^{b,c}	7,9±0,5 ^{b,c}	7,8±0,4 ^{b,c}	8,1±0,3 ^{b,c}	8,0±0,2 ^{b,c}	7,7±0,3 ^{b,c}

Em que: **Var** - Variável; **Gp** - Grupos; **T₀ a T₈** - Antes do início do treino a oitava semana de treino; **NC** - Nutrido controle; **NT** - Nutrido treino; **DC** - Desnutrido controle; **DT** – desnutrido treino. Dados em média e desvio padrão. Teste t Student (p<0,05). **a** – Diferença intra-grupo nutrido. **b** – Diferença intra-grupo desnutrido. **c**- diferença entre os grupos treinos (efeito do treino) e **d** - diferença entre os grupos desnutridos em relação aos nutridos (efeito da desnutrição).

Tabela 2 - Análise da contagem de leucócitos diferenciais do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os grupos nutrido e desnutrido durante 8 semanas de TFM.

Var Gp	Semanas de treino									
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	
Linfócitos	NC	72,0 ±2,6	71,3 ±2,7	70,3 ±1,5	69,1 ±1,9	68,8 ±1,4	69,1 ±1,9	68,1 ±0,9	67,8 ±1,9	67,0 ±2,1
	NT	71,5 ±3,3	71,0 ±2,2	71,1 ±2,4	70,1 ±2,7	71,0 ±2,1	72,5 ±2,6 ^a	74,1 ±1,8 ^a	76,0 ±0,8 ^a	78,5 ±1,3 ^a
	DC	70,1 ±2,9	70,8 ±2,3	71,0 ±2,6	68,8 ±2,9	68,0 ±1,4	67,8 ±1,7	68,0 ±1,5	68,0 ±1,4	67,8 ±1,7
	DT	70,3 ±2,7	70,1 ±2,6	69,5 ±1,7	71,1 ±2,7	72,5 ±2,9 ^b	73,0 ±2,5 ^b	73,5 ±4,5 ^b	74,5 ±5,9 ^b	75,0 ±4,3 ^b
Neutrófilos	NC	20,1 ±1,4	20,0 ±1,1	19,5 ±1,0	18,0 ±1,6	19,0 ±2,0	18,9 ±2,1	19,0 ±2,1	20,1 ±1,9	19,1 ±1,6
	NT	19,1 ±1,3	19,3 ±1,3	18,8 ±1,6	18,6 ±1,1 ^a	19,8 ±1,5 ^a	20,0 ±1,2 ^a	20,7 ±1,5 ^a	22,1 ±0,6 ^a	22,5 ±1,7 ^a
	DC	19,8 ±1,7	20,0 ±1,1	18,8 ±1,1	19,5 ±1,8	18,8 ±2,5	18,1 ±2,1	18,6 ±2,0	18,8 ±1,9	19,1 ±1,6
	DT	19,5 ±1,2	20,0 ±1,1	21,0 ±0,8	21,5 ±2,5 ^b	22,1 ±2,3 ^b	23,0 ±2,8 ^b	23,8 ±2,2 ^b	24 ±1,8 ^{b,c}	25,5 ±2 ^{b,c}
Monócitos	NC	5,3 ±2,1	5,5 ±2,1	6,0 ±0,8	5,8 ±1,3	5,5 ±1,8	6,6 ±1,3	6,5 ±1,0	5,8 ±1,7	5,8 ±1,4
	NT	5,5 ±1,8	5,8 ±1,6	6,0 ±0,8	7,0 ±1,1	6,8 ±0,4	7,3 ±1,2 ^a	8,0 ±0,6 ^a	9,0 ±0,6 ^a	9,5 ±0,8 ^a
	DC	4,8 ±1,3	4,6 ±0,8	5,0 ±1,4	4,8 ±0,7	3,8 ±1,1	3,8 ±0,9	4,1 ±0,7	3,8 ±0,7	4,1 ±1,1
	DT	5,1 ±0,9	5,5 ±0,8	5,5 ±1,6	6,0 ±2,1	6,8 ±0,9 ^b	6,6 ±1,2 ^b	7,1 ±1,4 ^b	7,5 ±1,8 ^b	8,0 ±2,2 ^b
Eosinófilos	NC	2,3 ±0,8	3,1 ±1,3	3,5 ±1,2	2,5 ±1,0	3,0 ±0,6	3,8 ±0,7	2,8 ±0,7	2,8 ±0,7	2,8 ±0,9
	NT	3,1 ±1,1	4,0 ±0,8	3,5 ±1,3	3,5 ±1,0	3,8 ±1,1	3,8 ±0,7	4,0 ±0,8	4,1 ±0,7	4,1 ±0,9
	DC	3,5 ±1,0	3,8 ±0,9	4,1 ±0,7	3,8 ±0,9	3,5 ±1,0	3,0 ±0,8	3,8 ±0,7	3,1 ±1,3	2,8 ±0,7
	DT	3,5 ±1,0	4,0 ±0,8	3,8 ±1,1	3,6 ±0,8	4,0 ±0,8	3,5 ±1,0	4,3 ±0,8	3,8 ±0,9	4,0 ±0,8

Em que: Var - Variáveis; GP - Grupos; T₀ a T₈ - Antes do início do treino a oitava semana de treino; NC - Nutrido controle; NT - Nutrido treino; DC - Desnutrido controle; DT - desnutrido treino. Dados em média e desvio padrão. Teste t Student (p<0,05). **a** - Diferença intra-grupo nutrido. **b** - Diferença intra-grupo desnutrido. **c** - diferença entre os grupos treinos (efeito do treino).

Tabela 3 - Análise dos índices hematimétricos do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os grupos nutrido e desnutrido.

Var.	Gp	Semanas de treino								
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Hemoglobina (g/100ml)	DC	11,5 ±0,5 ^d	11,8 ±0,9	10,8 ±0,6	11,1 ±0,8	11,5 ±0,6	11,0 ±0,4	11,6 ±0,4	12,1 ±0,2	11,8 ±0,2
	DT	11,2 ±0,4 ^d	12,5 ±0,4 ^c	11,9 ±1,1	12,2 ±0,9	12,8 ±0,6 ^b	13,0 ±0,1 ^b	12,9 ±0,9 ^b	13,2 ±0,7 ^b	13,6 ±0,5 ^b
	NC	12,0 ±0,3	11,9 ±0,4	12,5 ±0,5	11,9 ±0,7	12,0 ±1,0	12,1 ±0,4	11,9 ±0,5	12,4 ±0,5	12,6 ±0,5
	NT	12,2 ±0,4	13,6 ±0,6 ^a	12,4 ±0,5	12,6 ±0,6	13,0 ±1,0	13,4 ±0,9 ^a	13,6 ±0,5 ^a	14,0 ±0,6 ^a	14,1 ±0,6 ^a
Hemácia x10 ⁶ /mm ³	DC	7,2 ±0,4 ^d	7,4 ±0,7	7,0 ±0,2	7,5 ±0,4	7,3 ±0,5	6,9 ±0,5	7,1 ±0,2	7,3 ±0,3	7,5 ±0,6
	DT	7,5 ±0,1 ^d	7,8 ±0,3 ^c	7,3 ±0,4	7,6 ±0,4	8,5 ±0,2 ^b	7,8 ±0,3 ^b	8,1 ±0,1 ^b	8,2 ±0,4 ^b	8,5 ±0,1 ^b
	NC	7,9 ±0,2	8,4 ±0,1	8,1 ±0,2	8,2 ±0,1	8,0 ±0,3	7,5 ±0,2	7,6 ±0,2	7,8 ±0,2	8,1 ±0,2
	NT	8,2 ±0,2	8,6 ±0,2	8,2 ±0,2	8,3 ±0,1	8,2 ±0,4	8,1 ±0,2 ^a	8,3 ±0,2 ^a	8,6 ±0,2 ^a	8,8 ±0,4 ^a
Hematócrito (%)	DC	47,0 ±4,9	46,5 ±4,4	49,1 ±3,1	48,6 ±2,1	48,3 ±2,7	46,3 ±6,1	49,3 ±3,7	51,3 ±1,6	50,1 ±2,3
	DT	47,3 ±6,1	43,6 ±9,8	48,1 ±3,9	48,0 ±4,9	50,3 ±2,5	50,6 ±1,3	50,0 ±2,3	49,6 ±2,5	53,3 ±1,8 ^b
	NC	48,6 ±5,1	49,1 ±5,6	38,8 ±7,2	47,5 ±3,3	45,0 ±4,8	45,5 ±3,9	48,6 ±1,5	52,0 ±2,0	52,3 ±1,9
	NT	51,8 ±1,6	49,1 ±1,4	52,6 ±1,7 ^a	51,5 ±2,5 ^a	53,0 ±3,3 ^a	51,8 ±2,4 ^a	52,0 ±1,7 ^a	42,5 ±2,7 ^a	55,3 ±1,7 ^a

Em que: **Var** - Variáveis; **Gp** - Grupos; **T₀** a **T₈** - Antes do início do treino a oitava semana de treino; **NC** - Nutrido controle; **NT** - Nutrido treino; **DC** - Desnutrido controle; **DT** - desnutrido treino. Dados em média e desvio padrão. Teste t Student (p<0,05). **a** - Diferença intra-grupo nutrido. **b** - Diferença intra-grupo desnutrido. **c** - diferença entre os grupos treinos (efeito do treino) e **d** - diferença entre os grupos desnutridos em relação aos nutridos (efeito da desnutrição).

ARTIGO III

“A desnutrição precoce na produção de óxido nítrico, taxa de fagocitose, resposta leucocitária e hematimétrica de ratos treinados e submetidos ao estresse de contenção”.

Resumo

Objetivo: Analisou-se a influência da desnutrição neonatal **DN** na produção de Óxido Nítrico **NO**, Taxa de Fagocitose **TF**, Leucócitos totais **LT**, Diferenciais **LD** e Hematimetria de 36 ratos Wistar machos adultos (60 dias), treinados ou não, submetidos ao estresse de contenção **EC**. **Materiais e Métodos:** O grupo nutrido treino **NT** e controle (caseína 17%) e seus pares desnutridos (8%), foram avaliados antes (**T₀**) e após (**T₈**) o treinamento físico moderado **TFM** em esteira (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas) e após o **EC** (40min. após **T₈**), retirando-se uma alíquota de 0,1 mL de sangue da cauda dos animais para análise. Avaliou-se: **LT** (hemocítômetro); **LD** (esfregaço sanguíneo); hemoglobina (cianometemoglobina); hematócrito (micro-hematócrito); hemácias (hemocítômetro); **NO** (reação de Griess) e **TF** (percentual de macrófagos que englobaram o fungo). No **EC**, mantiveram-se os animais em cilindros de plástico PVC (24 cm de comprimento x 8 cm de diâmetro), onde permaneceram imobilizados durante 40 minutos. Utilizou-se o teste t pareado e não pareado ($p < 0,05$), dados em média e desvio padrão. **Resultados:** Houve diferença significativa pós **EC** nos **NT** e **DT** em: **LT** ($9,5 \pm 0,5$), ($6,1,0 \pm 0,1$); neutrófilos **PMN-N** ($20 \pm 2,1$), ($17 \pm 1,5$); monócitos **PMN-M** ($7,6 \pm 0,9$), ($5,7 \pm 1,6$) e no **NO** com LPS ($30,9 \pm 3,7$), ($25,4 \pm 1,7$) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística pós **EC** nos **grupos** treino em: Linfócitos; Eosinófilos; Hemoglobina; Hematócrito; Hemácia e na **TF**. **Resultados:** O **TFM** e a recuperação nutricional **RN**, alteraram **LT**, **PMN-N**, **PMN-M** e **NO** com LPS. **Conclusão:** O **TFM** e a **RN**, parecem atenuar as repercussões induzidas pela **DN** e o **EC** no **DT**.

Termos de indexação: Exercício físico, desnutrição neonatal, leucócitos, Óxido Nítrico, Hematimetria, Fagocitose

“The early malnutrition didn't alter the nitric oxide production, phagocytosis rate, leukocyte and hematimetric response in trained rats and submitted to the contention stress”.

Abstract

Objective: the neonatal malnutrition on influence was analyzed on nitric oxide no production in the, phagocytosis rate **PR**, leukocytes total **LT**, differentiates **DL** and hematological analysis of 36 wistar adult male rats (60 days), trained or not, submitted to the contention stress **CS**. Methods: The trains nurtured group **TN** and control (casein 17%) and your undernourished pairs (8%), were before appraised (T0) and after (T8) the moderate physical training **MFT** in wake (60min./day, 5 days/week, for 8 weeks) and after **CS** (40min. after T8), leaving a 0,1 mL blood aliquot of the animals tail for analysis. It was evaluated: **LT** (hemocytometer); **DL** (blood smears); hemoglobin (cianomethemoglobin); hematocrit (personal hematocrit-computer); red blood cells (hemocytometer); nitric oxide (Griess reaction) and **TF** (macrophages percentile that included the mushroom). In **CS**, the animals were maintained in PVC plastic cylinders (length 24 cm x diameter 8 cm), and stayed immobilized for 40 minutes. Paired and Non-paired t-test was used ($p < 0.05$), expresses data in mean and standard deviate. Results: There was significant difference after **CS** in **TN** and training malnourished **TM** in: **LT** ($9,5 \pm 0,5$), ($6,1,0 \pm 0,1$); neutrophils **PMN-N** ($20 \pm 2,1$), ($17 \pm 1,5$); monocytes **PMN-M** ($7,6 \pm 0,9$), ($5,7 \pm 1,6$) and in the **NO** with lipopolysaccharide **LPS** ($30,9 \pm 3,7$), ($25,4 \pm 1,7$) ($p < 0.05$). There was not statistical difference after **CS** in the groups training in: Lymphocytes; Eosinophils; Hemoglobin; Hematocrit; Red blood cells and in **PR**. **Discussion:** **MFT** and the nutritional recovery **NR** altered **LT**, **PMN-N**, **PMN-M** and **NO** with **LPS**. Conclusion: **MFT** and **NR** seem to attenuate the repercussions induced by **NM** and **CS** in **TM**.

Indexation terms: Physical exercise, neonatal malnutrition, leukocytes, Nitric Oxide, hematological analysis, Phagocytosis

INTRODUÇÃO

Os efeitos da desnutrição são caracterizados por induzir alterações na imunocompetência do indivíduo, assim, um suprimento adequado de nutrientes é imprescindível para a manutenção do crescimento e homeostasia dos sistemas orgânicos. O estresse físico, químico ou psicológico, parece alterar essa homeostasia¹, desencadeando respostas fisiológicas e comportamentais^{1,2}. O sistema imune parece sensível a essas alterações³, as quais podem intervir na dinâmica e função de suas células, como ocorre na realização do exercício físico.

O treinamento físico moderado **TFM** induz alterações imunológicas como a liberação de mediadores inflamatórios, citocinas, ativação leucocitária e da fagocitose por macrófagos⁴. Essas alterações promovem ajustes homeostáticos⁵, sejam como uma resposta a um estresse físico⁶ ou a pré-disposição de adaptação ao treino. Essa adaptação pode gerar uma maior demanda energética ao sistema cardiorespiratório, melhorando a captação e absorção de oxigênio, transporte sanguíneo e reabsorção celular⁷, além do consumo máximo de oxigênio $V_{O_2 \text{ máx}}$.

Poucos trabalhos utilizando fases de um protocolo de **TFM** compararam essas respostas com as induzidas por um estresse de contenção **EC** em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal **DN** e posterior recuperação nutricional **RN**. Neste sentido, caracterizamos a interveniência desses fatores sobre as variáveis estudadas em cada fase experimental, elucidando detalhadamente suas associações. Desta forma, analisou-se a influência da **DN** na a produção de Óxido Nítrico, taxa de fagocitose, resposta leucocitária e hematimétrica em ratos treinados ou não e submetidos ao **EC**.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. O biotério central é mantido a uma temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo invertido de 12 horas (claro – 21h00 às 09h00; escuro – 09h01 às 20h59). Nesse biotério, os animais são criados em gaiolas de polipropileno, com ração e água *ad libitum*. Os animais adultos que originaram as amostras foram encaminhados ao biotério experimental com ciclo invertido (claro: 20h00 as 08h00 e escuro: 08h01 as 19h59), onde, antes de iniciar a cópula, passaram por um período de 15 (quinze) dias de adaptação ao novo ambiente.

O acasalamento foi feito numa proporção de um macho para duas fêmeas. A prenhez foi observada pelo aumento do ventre das fêmeas, as quais foram colocadas em gaiolas individuais até o parto. Considerou-se o primeiro dia pós-parto como o início do aleitamento, onde os grupos foram compostos por seis filhotes machos por mãe. Estas foram divididas em um grupo desnutrido (desnutrição neonatal – **DN**), com dieta hipoprotéica (caseína 8%) e um nutrido, com normoprotéica (caseína 17%). Os filhotes receberam a dieta de forma indireta, a partir do leite materno.

A partir do vigésimo segundo dia de vida (desmame), as mães foram submetidas a ortanásia e os filhotes divididos em três por gaiola, de acordo com a dieta consumida no período neonatal e passaram a consumir labina até o final do experimento (120º dia) para a recuperação nutricional - **RN**. Esta é adotada como dieta padrão no biotério central, pois contém 23% de proteínas mistas. Aos sessenta dias de vida, os animais foram divididos de acordo com o **TFM** e manipulação da dieta⁸; quanto ao treino, em treinados ou não; quanto a dieta, em nutridos e desnutridos.

Os grupos foram subdivididos em nutridos treino **NT** (n=6), controle treino **CT** (n=6) e normativo **N** (n=6) e seus pares desnutridos. Os grupos treinos foram submetidos a um protocolo de **TFM** em esteira rolante (60min./dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas⁹ – **T₁** a **T₈**), enquanto o grupo controle permaneceu em suas gaiolas, as quais foram deslocadas da estante para junto da esteira apenas no momento do treino. Já o normativo, isento do **TFM**, controlou os procedimentos realizados com o grupo controle, mantendo o princípio do experimento.

Análises dos parâmetros leucocitários e hematimétricos

Foram coletadas antes do início do protocolo de treino **T₀** e 24 horas após a última sessão **T₈**, uma pequena alíquota de sangue (0,1 mL) da cauda dos animais, devidamente anestesiados. Dessa, 0,5 mL para realização dos índices hematimétricos (hemoglobina, hematócrito e hemácias) e 0,5 mL para o leucograma (contagem total e diferencial de leucócitos). O sangue extraído foi depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido de uma gota (20 µl) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA.

Para determinação da hemoglobina utilizou-se 10 µL de sangue diluído em 5mL de solução hipotônica “técnica de cianometemoglobina”¹⁰. Para tal, obteve-se a extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos e formação do produto colorido cianometemoglobina, a partir da reação da hemoglobina com cianetos. A concentração

foi inferida por espectrofotometria (Beckman DU-62) com filtro de 540 nm, expressa em mg/dl através da fórmula: $Hb = DO \text{ da amostra} \times FC$, onde: Hb = concentração de hemoglobina, DO = densidade óptica e FC = factor de conversão.

Os valores de hematócrito foram determinados em percentagem pela técnica de micro-hematócrito em leitor de microcapilar por centrifugação (International Microcapillary Reader. IEC). Para a contagem de hemácias por 1mm^3 de sangue foi utilizada solução tampão fosfato de sódio (PBS) a 0,1M com pH=7.4 na proporção de 1:200 em hemocítmetro. Para o cálculo foi utilizada a fórmula: $Hm \times 5 \times 200 \times 10$, onde: Hm = número total de hemácias contadas (em $1/5$ de mm^2); 5 = factor de conversão para 1mm^2 ; 200 = factor de conversão da diluição utilizada; 10 = factor de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina). O resultado foi obtido em número de células/ml de sangue. Para a contagem total de leucócitos as amostras de sangue foram diluídas (1:200) em solução de TURK (ácido acético a 3%)¹¹.

Os leucócitos foram contados em hemocítmetro com auxílio do microscópio óptico, sendo o resultado obtido pela expressão: $\text{Leucócitos} \times \text{mm}^3 \text{ de sangue} = (Lc. \times 20 \times 10)/4$, onde: Lc = número total de leucócitos contados em 4mm^2 ; 4 = fator de conversão para 1mm^3 ; 20 = factor de conversão da diluição utilizada; 10 = fator de conversão para 1mm^3 (profundidade da lâmina). Na contagem diferencial de leucócitos utilizou-se a técnica do esfregaço sanguíneo e para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico KACIL com teclas correspondentes a cada tipo de célula.

Taxa de fagocitose por macrófagos alveolares

Foram utilizados fungos (*Saccharomyces* sp.) para avaliar a taxa de fagocitose de acordo com a técnica de Malageño et al.¹². Os fungos foram lavados 2 vezes com solução PBS, contados 107 células e em seguida misturados na suspensão de macrófagos ($1 \times 10^6/\text{ml}$ em meio de cultura completo, RPMI 1640) recuperados do lavado broncoalveolar. As células (macrófagos e fungos) foram distribuídas em lâminas de microscopia óptica e incubados a 37°C , em atmosfera úmida durante 1 hora. As lâminas foram lavadas com água destilada e utilizado o kit panótico rápido para a coloração. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram o fungo em uma contagem total de 200 células.

Indução do estresse de contenção - EC

A seguir à última sessão do **TFM** (24 horas), todos os animais de cada grupo foram submetidos ao **EC**. Para obtenção do estresse agudo, os animais foram mantidos em cilindros de plástico PVC (24 cm de comprimento x 8 cm de diâmetro), onde permaneceram imobilizados durante 40 minutos¹³.

Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos alveolares

A liberação de **NO** foi mensurada pelo método colorimétrico quantitativo (reação de Griess - **RG**)¹⁴. Em triplicata, alíquotas de 500 µL dos sobrenadantes de cultura foram incubadas à temperatura ambiente por 10 min. com 500 µL de **RG** imediatamente preparados (sulfanilamida a 1% e naftiletieno a 0,1% em ácido ortofosfórico a 5%). A absorbância no Spectrophotometer BEL Photonics 1105 foi de 550 nm. Determinou-se a concentração de nitrito por meio de uma curva padrão construída com nitrato de sódio nas concentrações de 0-100 µM. Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a RPMI-1640 incubado por 24 horas nas mesmas placas das amostras, mas, na ausência de células. Os resultados foram expressos em µM de nitrato por 5×10^5 células.

As interveniências da **DN**, **RN** e do **TFM** em relação às respostas ao estresse de contenção **EC** sobre as variáveis do estudo, foram caracterizadas pela comparação com o tempo zero **T₀** - avaliação antes do início do protocolo de treino ou referência basal e com a oitava semana de treino - **T₈**. Para as análises de cada grupo, utilizamos o intervalo (**T₀-T₈**) para a **DN** e **RN** e (**T₈-T₀**) para o **TFM**. Este estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco sob o ofício nº 76/07 do processo nº 008226/2007-55 e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação animal (COBEA).

Análise estatística

Para a análise da distribuição normal e homogeneidade de variâncias dos dados, utilizou-se os testes ShapiroWillks e Bartlet. Foi confirmado o teste t de *Student* pareado e não pareado para análise intra e entre os grupos, com dados em média e desvio padrão, com $p < 0,05$. Para o controle do experimento, testamos os grupos **N** e **CT**, onde não foi identificada diferença significativa entre as variáveis dos mesmos. Logo, para todas as comparações possíveis, utilizaram-se os grupos **NT**, **NC**, **DT** e **DC**.

RESULTADOS

Contagem de leucócitos totais

A tabela 1 representa a resposta da contagem de leucócitos totais do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os grupos **NT**, **NC**, **DT** e **DC** nos tempos zero **T₀** e oito **T₈** do **TFM** e após serem submetidos ao **EC**. Houve diferença significativa na comparação do grupo **NC** em **T₀** ($7,97 \pm 0,29$) e **T₈** ($7,38 \pm 0,41$) em relação ao **EC** ($6,15 \pm 0,29$) e no **NT** em **T₀** ($8,09 \pm 0,26$) e **T₈** ($10,98 \pm 0,19$) em relação ao **EC** ($9,53 \pm 0,57$) ($p < 0,05$). No **DC** em **T₀** ($6,64 \pm 0,48$) e **T₈** ($6,89 \pm 0,19$) em relação ao **EC** ($5,37 \pm 0,38$) e no **DT** em **T₀** ($6,78 \pm 0,17$) e **T₈** ($7,70 \pm 0,34$) em relação ao **EC** ($6,18 \pm 0,37$) ($p < 0,05$). Além do **NC** ($6,15 \pm 0,29$) em relação ao **DC** ($5,37 \pm 0,38$) e entre os **NT** ($9,53 \pm 0,57$) e **DT** ($6,18 \pm 0,37$) após **EC** ($p < 0,05$).

Tabela 1

Leucócitos diferenciais

A tabela 2 representa a resposta da contagem dos leucócitos diferenciais intra e entre os grupos **NT**, **NC**, **DT**, **DC** em **T₀** e **T₈** do **TFM** e após o **EC**. Nos linfócitos, houve diferença significativa na comparação do grupo **NC** em **T₀** ($72 \pm 2,68$) e **T₈** ($67 \pm 2,1$) em relação ao **EC** ($57,7 \pm 3,2$) ($p < 0,05$). Resposta semelhante foi observada no **NT** em **T₀** ($71,5 \pm 3,3$) e **T₈** ($78,5 \pm 1,3$) em relação ao **EC** ($62,6 \pm 3,3$) ($p < 0,05$); no **DC** em **T₀** ($70,2 \pm 2,9$) e **T₈** ($67,8 \pm 1,7$) em relação ao **EC** ($50,1 \pm 2,1$) e no **DT** em **T₀** ($70,3 \pm 2,7$) e **T₈** ($75 \pm 4,34$) em relação ao **EC** ($63 \pm 3,6$) ($p < 0,05$). Já entre os **NT** ($62,6 \pm 3,3$) e **DT** ($63 \pm 3,6$) após o **EC**, não foi observada diferença significativa.

Nos Neutrófilos, verificou-se a diferença significativa no **NC** em **T₀** ($20,1 \pm 1,47$) e **T₈** ($19,1 \pm 1,6$) em relação ao **EC** ($9,5 \pm 1$) e no **DC** em **T₀** ($19,8 \pm 1,7$) e **T₈** ($67,8 \pm 1,7$) em relação ao **EC** ($10,1 \pm 1,4$) ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa no **NT** em **T₀** ($19,1 \pm 1,3$) em relação ao **EC** ($20 \pm 2,1$), entretanto, o **EC** foi diferente do **NT** em **T₈** ($22,5 \pm 1,7$) ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre o **DT** em **T₀** ($19,5 \pm 1,2$) e o **EC** ($17 \pm 1,5$), o qual foi diferente do **DT** em **T₈** ($25,5 \pm 2,4$) ($p < 0,05$). Essa diferença foi mantida entre os **NT** ($20 \pm 2,1$) e **DT** ($17 \pm 1,5$) após o **EC** ($p < 0,05$) (tabela 2).

Nos Monócitos, houve diferença significativa na comparação do **NC** em **T₀** ($5,33 \pm 2,1$) e **T₈** ($5,83 \pm 1,4$) em relação ao **EC** ($2,67 \pm 0,8$); no **NT** em **T₀** ($5,5 \pm 1,8$) e **T₈**

($9,5\pm 0,8$) em relação ao **EC** ($7,6\pm 0,9$); no **DC** em **T₀** ($5,17\pm 0,9$) e **T₈** ($8\pm 2,2$) em relação ao **EC** ($3,2\pm 0,6$) e no **DT** ($8\pm 2,2$) em relação ao **EC** ($5,7\pm 1,6$) em **T₈** ($p<0,05$). Entretanto, não houve significância entre o **DT** ($5,17\pm 0,9$) em relação ao **EC** ($5,7\pm 1,6$) em **T₀**. Já entre os **NT** ($7,6\pm 0,9$) e **DT** ($5,7\pm 1,6$) após o **EC**, foi observada diferença significativa ($p<0,05$). Já nos Eosinófilos, não foram observadas diferenças estatísticas intra e entre os grupos experimentais em **T₀** e **T₈** em relação ao **EC** (tabela 2).

Tabela 2

Índices hematimétricos

A tabela 3 representa a resposta dos índices hematimétricos do sangue periférico de ratos adultos intra e entre os grupos **NT**, **NC**, **DT**, **DC** em **T₀** e **T₈** do **TFM** e após o **EC**. Ao realizarmos as comparações intra e entre os grupos experimentais em relação ao **EC**, não observamos diferenças estatísticas entre os mesmos.

Tabela 3

Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos alveolares

A tabela 4 representa a produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares de ratos adultos intra e entre os grupos **NT**, **NC**, **DT** e **DC** após serem submetidos ao **EC**. Houve diferença significativa entre o grupo **DT** com LPS ($25,44\pm 1,78$) e o **DT** sem LPS ($15,03\pm 3,73$); **DC** com LPS ($16,92\pm 3,83$) e o **DC** sem LPS ($10,87\pm 5,03$); **DT** com LPS ($25,44\pm 1,78$) e o **DC** com LPS ($16,92\pm 3,83$) ($p<0,05$). Entretanto, não foi observada diferença entre o **DT** sem LPS ($15,03\pm 3,73$) e o **DC** sem LPS ($10,87\pm 5,03$).

Foi observada diferença significativa entre o grupo **NT** com LPS ($30,91\pm 3,70$) e o **NT** sem LPS ($14,48\pm 4,10$); **NC** com LPS ($16,38\pm 4,15$) e o **NC** sem LPS ($9,93\pm 4,97$); **NT** com LPS ($30,91\pm 3,70$) e o **NC** com LPS ($16,38\pm 4,15$); além do **NT** sem LPS ($14,48\pm 4,10$) e o **NC** sem LPS ($9,93\pm 4,97$) ($p<0,05$). Já nos grupos treinos com LPS, houve diferença estatística entre o **NT** ($30,91\pm 3,70$) e o **DT** ($25,44\pm 1,78$), contudo, não

houve diferença entre seus controles **NC** ($16,38 \pm 4,15$) e o **DC** ($16,92 \pm 3,83$) e entre os grupos treinos sem LPS, o **NT** ($14,48 \pm 4,10$) e o **DT** ($15,03 \pm 3,73$).

Tabela 4

Taxa de Fagocitose por macrófagos alveolares

A figura 1 representa a taxa de fagocitose realizada por macrófagos alveolares intra e entre os grupos **NT**, **NC**, **DT** e **DC**, após o **EC**. Antes de realizarmos as comparações múltiplas entre os grupos, verificamos que não houve diferença significativa entre os grupos **DC** ($53,33 \pm 6,89$) e o **NC** ($49 \pm 14,18$). Logo, passamos a ter apenas um grupo controle para as comparações múltiplas. Houve diferença significativa entre os grupos **DT** ($94,33 \pm 24,51$) e o **DC** ($55,33 \pm 6,89$) e entre o **NT** ($112 \pm 16,49$) e o **NC** ($49 \pm 14,18$) ($p < 0,05$). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre o **DT** ($94,33 \pm 24,51$) e o **NT** ($112 \pm 16,49$).

Figura 1

DISCUSSÃO

Avaliaram-se as repercussões fisiológicas induzidas pelo **EC** nas séries branca e vermelha do sangue periférico de ratos machos adultos treinados e desnutridos precocemente ou não. Analisou-se na série branca os leucócitos totais **LT** e diferenciais **LD** (neutrófilos **PMN-N**, linfócitos **L**, eosinófilos **E** e monócitos **MNN-M**) e na vermelha os hematócritos **Ht**, as hemoglobinas **Hg** e as hemácias **Hm**. Para identificar a influência da **DN**, **RN** e do **TFM** sobre as respostas ao **EC** nas variáveis, comparamos seus resultados nos intervalos (**T₀** e **T₈**) para o efeito da **DN** e **RN** e em (**T₈** e **T₀**) para o **TFM**, intra e entre os grupos experimentais.

O sistema imune parece ser sensível tanto aos agentes infecciosos como às alterações na homeostasia orgânica³. Tanto a **RN** quanto o **TFM** parecem intervir de forma específica ou interativa nas repercussões causadas pela **DN** no equilíbrio orgânico do animal, fato que foi confirmado em nosso trabalho. Nesse sentido, buscaram-se as

possíveis adaptações fisiológicas induzidas por esses fatores, em resposta ao **EC** em células imunes e de captação e transporte de Oxigênio O_2 .

Em nosso trabalho, o **EC** reduziu o número de **LT** no grupo **DC** em relação a **T₀** e **T₈**. Esse resultado indica que a **RN** no **DC** não foi eficiente ao ponto de minimizar a influência do **EC**, já que seus valores ficaram abaixo do **NC** pós-contenção. Essa resposta sugere a eficiência do modelo de desnutrição aplicada. O período neonatal é caracterizado por uma maior demanda de calorias e proteínas, necessárias à função celular e ao fornecimento de energia para o metabolismo¹⁵. As alterações impostas nesse período interferem na formação de órgãos linfóides¹⁶ e na expansão e alteração leucocitária na fase adulta¹⁷.

O **TFM** atenuou o efeito do **EC** sobre os **LT** dos **NT**, já que os valores obtidos na contenção ficaram entre **T₈** e **T₀**. Entretanto, houve redução significativa no número dessas células no **DT**, pois, mesmo com a realização do **TFM** esses valores ficaram abaixo de **T₈** e **T₀**. É importante ressaltar que os valores dos **LT** no **DT** após o **EC** estavam próximos ao **T₀**. Talvez, a eficiência do **TFM** estivesse ligada a um período mais longo de treino. A intensidade, o tipo e a duração do exercício físico parecem modular a dinâmica e a função de algumas células imunes¹⁸.

É provável que o uso de animais desnutridos precocemente e o **TFM** em esteira rolante, tenham induzido as diferenças entre os resultados. Em outro estudo, o **EC** induziu a redução dos **LT** de animais sedentários e desnutridos no período neonatal²⁰. Nossos resultados corroboram com esse experimento, mesmo considerando que um dos nossos grupos desnutridos realizou **TFM**, indicando nesse caso, que o treino não atenuou a influência desse tipo de estresse nessas células.

O **EC** induziu efeitos distintos nos **LD** de ratos desnutridos precocemente. Verificamos que tanto a **RN** (**T₀** e **T₈**) quanto o **TFM** (**T₈** e **T₀**) não foram eficazes ao ponto de atenuar a influência do **EC** sobre os linfócitos, nos grupos nutridos e desnutridos. Talvez essas células sejam responsivas a esse tipo de estímulo, podendo desencadear no hospedeiro uma linfopenia. Nos neutrófilos **PMN-N**, o **EC** alterou seu número nos controles, reduzindo esses valores em relação a **T₀** e **T₈**. Mesmo com esse resultado, a **RN** no **DC** foi eficiente ao ponto de minimizar a influência do **EC**, já que os valores desse grupo foram semelhante ao **NC** pós-contenção.

O **TFM** atenuou as possíveis repercussões causadas pelo **EC** nos **PMN-N** do **DT** pós-contenção, já que seus valores ficaram abaixo de **T₈** e não diferiram em **T₀**. Esses resultados podem ser consequência da interação entre a **RN** e o **TFM**. O **EC**

alterou o número dos **PMN-M** nos grupos controles, reduzindo seus valores em relação a **T₀** e **T₈**. Neste caso, a **RN** no **DC** minimizou a influência do **EC**, já que seus valores foram mais elevados que os do **NC** pós-contenção. Nos **E** e nos componentes da série vermelha, não foram observadas diferenças nos valores intra e entre os grupos experimentais pós-contenção, ressaltando as respostas celulares à **RN** (**T₀** e **T₈**) e ao **TFM** (**T₈** e **T₀**).

Os resultados obtidos nos **PMN-N** e **L** em nosso trabalho corroboram em parte, com outro ensaio que identificou uma redução no número de linfócitos e aumento nos neutrófilos do grupo controle, além do aumento do número dessas células no grupo exercitado após a contenção, comparados ao controle¹⁹. Nas demais células, não houve diferença entre os grupos experimentais¹⁹. Outro estudo que induziu a contenção, sem realizar **TFM**, não identificou alteração, em praticamente, todos os leucócitos diferenciais²⁰. Talvez algumas células sejam mais responsivas a quebra brusca da homeostase com interferência a diferentes tipos de estresse em um desenho experimental.

Em nosso trabalho, induzimos a **DN**, o **TFM** e o **EC**. Esses fatores podem ter associação com a liberação de hormônios do estresse, resultando numa redistribuição celular nos tecidos²¹. De fato, as células do sistema imune parecem possuir receptores para diferentes hormônios do estresse, como os glicocorticóides e catecolaminas²². Alguns estudos demonstraram que o estresse crônico, como foi o caso da **DN** e do **TFM**, podem alterar a imunorregulação dos glicocorticóides^{23,24}. Tal como o **EC**, sessões exaustivas de exercício intenso (estresse agudo) podem modular a liberação de catecolaminas e glicocorticóides, causando um estado de imunossupressão no hospedeiro²⁴.

Os resultados dos índices hematimétricos de nosso trabalho foram semelhantes a outro ensaio que, mesmo induzindo a contenção em animais nutridos e realizando **TFM**, não observou diferença nesses índices¹⁹. Em outro, mesmo com a aplicação da **DN**, mas, sem o **TFM**, também não foi observado diferenças nesses parâmetros²⁰. Nesse sentido, vale ressaltar que nossos resultados tendem a enfatizar o efeito positivo da **RN** e do **TFM** sobre essas células, já que, todos os valores pós-contenção, permaneceram nos intervalos entre (**T₀** e **T₈**) e (**T₈** e **T₀**).

Em outros estudos, foi observado um aumento no número de hematócrito e hemoglobina em animais submetidos ao estresse físico agudo^{25,26}. É possível que esses resultados sejam consequência da capacidade que os animais têm de estocar grande quantidade de hemácias no baço e expeli-las na circulação sob a condição de estresse²⁷.

Esse fenômeno pode induzir a liberação de catecolaminas, provocando o recrutamento de células dos órgãos linfóides secundários, como baço e linfonodos, para a circulação geral²⁶.

Os índices hematimétricos estão diretamente relacionados a captação e o fluxo de O_2 no organismo, neste sentido, o **EF** atua na melhoria dessa função²⁷. Tem sido descrito que durante o **TFM** ocorre um desbalanço redox temporário e aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio – **EROs**, os quais são característicos o superóxido, os radicais hidroxilas, o ácido hipoclorito e o Óxido Nítrico²⁸. Esses fazem parte da defesa do hospedeiro e seus indutores são microorganismos fagocitados. Esse mecanismo é essencial na defesa contra infecções e atua como fator de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose²⁸.

Em nosso trabalho avaliamos a liberação de Óxido Nítrico-**NO** e a taxa de fagocitose por macrófagos alveolares após **EC** em ratos desnutridos precocemente e submetidos na fase adulta a um **TFM**. Na produção de **NO**, verificamos que os grupos com **LPS**, obtiveram valores mais elevados que seus controles. Esses resultados no grupo **DT** parecem demonstrar que a **RN** aliada ao **TFM**, estimulou o aumento da produção de **NO** em relação aos não treinados com **LPS**. A interação entre a **RN** e o **TFM** também foi observada na taxa de fagocitose, onde de forma semelhante, o grupo **DT** obteve valores expressivos tanto em relação ao seu controle, quanto ao **NT**, a ponto de não existir a diferença entre esses grupos treinos.

Nossos resultados não corroboram com um estudo que não observou a diferença na produção de **NO** por macrófagos alveolares de ratos desnutridos, submetidos ao **TFM** de natação e estimulados com **LPS**²⁹. Para melhor identificar os níveis da produção de Óxido Nítrico, analisamos as respostas intra e entre os grupos experimentais. Talvez as diferenças sejam justificadas pelo tipo e período de treino, tipo de análise e indução das respostas, pois, ao final do **TFM** induzimos o **EC** nos grupos experimentais, ressaltando que os desenhos experimentais foram semelhantes.

Na taxa de fagocitose, o **TFM** de natação reverteu um quadro de diminuição da atividade fagocítica de macrófagos alveolares em ratos submetidos a um estresse psicológico de contenção¹⁹. Esses resultados fundamentam nossa análise, apesar de termos trabalhado também com animais desnutridos, em que sua taxa de fagocitose, por macrófagos alveolares, foi significativa em relação aos nutridos. Já em animais desnutridos precocemente e estressados psicologicamente quando adultos, mas, sem

realizar **TFM**, ocorreu uma diminuição na produção de superóxido dismutase por macrófagos alveolares²⁰.

As repercussões nutricionais em macrófagos são bem conhecidas principalmente quanto a produção das EROs²⁸. Estas têm sua produção elevada pela redução do consumo da vitamina E, que inibe a ativação da NADPH oxidase²⁸. Esse complexo enzimático, associado às membranas plasmática dos macrófagos é formado pela via das pentoses, presente no citoplasma dessa célula³⁰. Sua geração por essa via é importante para a função celular, já que em situações que se detectou a deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (principal enzima reguladora da via das pentoses) em fagócitos, a susceptibilidade as infecções era alta³⁰.

Ao analisarmos a produção de **NO** e a taxa de fagocitose por macrófagos alveolares, caracterizamos de uma forma ampla, as possibilidades de imunocompetência do sistema imune na função dos macrófagos alveolares de ratos desnutridos precocemente ou não, submetidos a um **TFM** ou não. A defesa antioxidante e a resposta induzida por microorganismos ressaltaram a importância de termos avaliado não apenas essas condições, mas, uma possível cascata de eventos que poderia ocorrer no organismo ao ser instalado o estresse oxidativo ou a alteração na função de macrófagos.

A modulação de EROs por macrófagos tem sido descrita recentemente como um importante papel biológico no desbalanço redox temporário, já que esse mecanismo celular regula o metabolismo, a resposta imunológica, a regulação vasomotora, adesão, proliferação e morte celular³⁰. Apesar da semelhança, fica difícil comparar nossos resultados com os da literatura, já que analisamos vários fatores intervenientes em um desenho experimental. Além da especificidade da verificação em que testamos a influência da **DN** e da **RN** nos intervalos **T₀** e **T₈** e a do **TFM** em **T₈** e **T₀**, considerando às obtidas pós-contenção.

Em função de nossos resultados podemos concluir que a desnutrição precoce não alterou a produção de óxido nítrico, taxa de fagocitose, resposta leucocitária e hematimétrica em ratos treinados e submetidos a estresse de contenção. Os efeitos desses fatores no grupo **DT** estabeleceram, em várias situações, valores significativos em relação aos nutridos. Essa respostas, tendem a sugerir uma possível interação entre a **RN** e o **TFM** frente a **DN**, em resposta ao **EC**, diagnosticando a real influência nas e das variáveis estudadas na área de saúde.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Selye, H. (1955). Stress and disease. *Science*, 43(1):122:625

Selye, H. *The Stress of life*. New York: McGraw Hill, 1956

Besedovsky, H.O. e A. Del Rey. Immune-neuro-endocrine interactions: Facuss and hypotheses. *Endocr Rev.* v.17.n.1, Feb, p.64-102.1996

Moraska A, Deak T, Spencer R, Roth D, Fleshner M (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279: R1321-R1329.

Afonso, M., Souza, C.N., Zagatto, A.M., Luciano, E. Respostas metabólicas agudas ao exercício físico moderado em ratos wistar. *Motriz*, Rio Claro, v.9, n.2, p. 87-92, Mai/Ago. 2003.

Green, K.J.; Rowbottom, D.G., Mackinnon, L.T. Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.92, n.6, p.2390-5, 2002.

Da Cruz, A.M. Resistência aeróbia e eritropoetina. *Estudos*, Goiânia, v.33, n. 7/8, p. 553-572, Jul./Ago. 2006.

Reeves, P.G. Nielsen, F.H. Fahey, G.C.J. 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. *Journal of Nutrition*. Urbana, Vol. 123 n. 11, pp. 1939-1951, 1993.

Leandro, C. G. Influência do treino de resistência moderado na resposta imunológica de ratos submetidos a contenção aguda. [Tese de Doutorado]. Portugal. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física – Universidade do Porto -2005

Hainline A Jr. (1958). *Standard methods of clinical chemistry*. New York: Academic Press.

Stibbe W, Weise M, Seidel, D. (1985). Automated platelet count in thrombocytopenic patients-a comparison of methods. *J Clin Chem Clin Biochem.* 23(7):399-404.

Malagueño E, Albuquerque C, de Castro CMMB, Gadelha M, Irmão JI, Santana JV (1998). Effect of Biomphalaria straminea Plasma in the Phagocytosis of Biomphalaria glabrata Hemolymph Cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 93(1): 301-302.

De Castro CB., Manhães-de-Castro R, Medeiros AF, Queirós A, Ferreira WT, Lima Filho JL. (2000) Effect of stress on the production of O₂ - in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 108 (1) 68-72.

Ding, A.H., Nathan, C.F., Stuehr, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 1988;141(7):2407-12

Curi, R., Pithon-Curi, T.C., Schumacher, R.I., Freitas, J.J.S., Lagranha, C., Palanch, A.C. Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol*, June (2003). Issue 6. Vol. 284: 1355-361.

Chandra, R.K., Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr* 2002; 3: 73-76

Cunningham-Rundles, S. McNeeley, D.F., Moon, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:1119-1128.

Hoffman-Goetz L, Simpson JR, Cipp N, Arumugam Y, and Houston ME. (1990). Lymphocyte subset responses to repeated submaximal exercise in men. *J Appl Physiol* 68: 1069-1074.

Nascimento, E., Cavalcante, T., Pereira, S., Palmeira, A., Rocha, M.A., Viana, M.T., Manhães-de-Castro, R., De-Castro, C.M.M.B., Duarte, J., Leandro, C.G. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2004, vol. 4, nº 3 [26–33].

Queiros-Santos, A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. [dissertação de Mestrado]. Recife. Univ. Federal de Pernambuco, 2000.

Green K, Rowbottom D, Mackinnon L (2002). Exercise and T-lymphocyte function: a comparison of proliferation in PBMC and NK cell-depleted PBMC culture. *J Appl Physiol*.92: 2390-2395.

Kim H, Shin S, Kim S, Lim B, Kim Y, Chung J, Kim H, Kim C (2003). Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague-Dawley rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 43: 99-104.

Shastry S, Toft D, Joyner (2002). HSP70 and HSP90 expression in leucocytes after exercise in moderately trained humans. *Acta Physiol Scand*. 175: 139-146.

Nieman, D.C., Bishop, N.C. Nutritional strategies to counter stress to the immune system in athletes, with special reference to football. *Journal of Sports Sciences*, London, v.24, n.7, p.763-72,2006.

Stewart I e McKenzie D (2002). The human spleen during physiological stress. *Sports Med*. 32 (6): 361-369.

Mineto, M.; Rainoldi, A.; Gazzoni, M.; Terzolo, M.; Borrione, P.; Termine, A.; Saba, L.; Dovio, A.; Angeli, A.; Paccotti, P. Differential responses of serum and salivary interleukin-IL6 to acute strenuous exercise. *European Journal of Applied Physiology*, Berlin, v.93, n.5-6, p.679-86, 2005.

Oliveira, E.M., Ramires, P.R., Lancha Júnior, A.H. Nutrição e bioquímica do Exercício. *Rev.. Paul. Educ. Fís., São Paulo*, V.18, p.7-19, ago. 2004. N. esp.

Leite, H.P., Sarni, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev. Bras.Nutr. Clin* 2003; 18(2):37-94

Porto, S.M.M.S., Araújo, F.R.G., Melo, J.F. Silva, R.R., Ferreira da Silva, K.M., De Castro, C.M.M.B. Cinética do perfil leucocitário do sangue, antes e após treinamento físico moderado, em ratos adultos desnutridos no período neonatal. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife*, 51(1), p. 59-65, 2006.

Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Review*, Washington, v.82, p.47-95, 2002

Tabela 1 – Resposta dos leucócitos totais intra e entre os grupos nutrido e desnutrido às fases do treino e ao estresse por contenção.

Var	Gp	Respostas às fases do treino e ao estresse por contenção					
		T ₀	EC	P<0,05	T ₈	EC	p<0,05
Leucócitos totais (x10 ³ /mm ³)	NC	7,97±0,29	6,15±0,29	0,00 ^a	7,38±0,41	6,15±0,29	0,00 ^a
	NT	8,09 ±0,26	9,53±0,57	0,00 ^b	10,98±0,19	9,53±0,57	0,00 ^b
	DC	6,64 ±0,48	5,37±0,38	0,00 ^c	6,89±0,19	5,37±0,38	0,00 ^c
	DT	6,78±0,17	6,18±0,37	0,00 ^{d,e}	7,70±0,34	6,18±0,37	0,00 ^{d,e}

Em que: Var – Variáveis; Gp - Grupos; T₀ e T₈ – Antes do início do treino e oitava semana de treino; EC – Estresse por contenção; NC - Nutrido controle; NT - Nutrido treino; DC - Desnutrido controle; DT - desnutrido treino; Dados em média e desvio padrão; Teste t Student pareado e não pareado (p<0,05). Diferenças após contenção: **a** – intra- grupo NC; **b** - intra-grupo NT; **c** - intra-grupo DC; **d** - intra-grupo DT; **e** – entre grupos treinos.

Tabela 2 – Resposta dos leucócitos diferenciais intra e entre os grupos nutrido e desnutrido às fases do treino e ao estresse por contenção.

Var	GP	Resposta às fases do treino e ao estresse por contenção					
		T ₀	EC	P<0,05	T ₈	EC	p<0,05
Linfócitos (%)	NC	72±2,68	57,7±3,2	0,00 ^a	67±2,1	57,7±3,2	0,00 ^a
	NT	71,5±3,3	62,6±3,3	0,00 ^b	78,5±1,3	62,6±3,3	0,00 ^b
	DC	70,2±2,9	50,1±2,1	0,00 ^c	67,8±1,7	50,1±2,1	0,00 ^c
	DT	70,3±2,7	63±3,6	0,03 ^d	75±4,34	63±3,6	0,00 ^d
Neutrófilos (%)	NC	20,1±1,47	9,5±1	0,00 ^a	19,1±1,6	9,5±1	0,00 ^a
	NT	19,1±1,3	20±2,1	0,78	22,5±1,7	20±2,1	0,00 ^b
	DC	19,8±1,7	10,1±1,4	0,00 ^c	19,1±1,6	10,1±1,4	0,00 ^c
	DT	19,5±1,2	17±1,5	0,05	25,5±2,4	17±1,5	0,00 ^{d,e}
Monócitos (%)	NC	5,33±2,1	2,67±0,8	0,01 ^a	5,83±1,4	2,67±0,8	0,00 ^a
	NT	5,5±1,8	7,6±0,9	0,02 ^b	9,5±0,8	7,6±0,9	0,00 ^b
	DC	5,17±0,9	3,2±0,6	0,02 ^c	8±2,2	3,2±0,6	0,00 ^c
	DT	5,17±0,9	5,7±1,6	0,47	8±2,2	5,7±1,6	0,00 ^{d,e}
Eosinófilos (%)	NC	2,3±0,8	2,1±0,6	0,61	2,8±0,9	2,1±0,6	0,16
	NT	3,1±1,1	3,3±1,8	0,7	4,1±0,9	3,3±1,8	0,09
	DC	3,5±1	2,3±0,5	0,07	2,8±0,7	2,3±0,5	0,2
	DT	3,5±1	3±1,1	0,41	4±0,8	3±1,1	0,07

Em que: Var – Variáveis; Gp - Grupos; T₀ e T₈ – Antes do início do treino e oitava semana de treino; NC - Nutrido controle; NT - Nutrido treino; DC - Desnutrido controle; DT - desnutrido treino; Dados em média e desvio padrão; Teste t Student (p<0,05). Diferenças após contenção: **a** – intra- grupo NC; **b** – intra- grupo NT; **c** – intra- grupo DC; **d** – intra-grupo DT; **e** – entre grupos treinos.

Tabela 3 - Respostas hematimétricas intra e entre os grupos nutrido e desnutrido às fases do treino e ao estresse por contenção.

Var	Gp	Respostas hematimétricas às fases do treino e ao estresse por contenção					
		T ₀	EC	p<0,05	T ₈	EC	p<0,05
Hemoglobina (g/100ml)	NC	12±0,3	10,1±2,6	0,1	12,6±0,5	10,1±2,6	0,06
	NT	12,2±0,4	12,2±2,2	0,9	14,1±0,6	12,2±2,2	0,06
	DC	11,5±0,5	11,6±0,3	0,57	11,8±0,2	11,6±0,3	0,22
	DT	11,2±0,4	11,5±2,3	0,8	13,6±0,5	11,5±2,3	0,056
Hemácia (x10 ⁶ /mm ³)	NC	7,9±0,2	7,6±0,6	0,45	8,1±0,2	7,6±0,6	0,19
	NT	8,2±0,2	8,1±0,6	1,00	8,8±0,4	8,1±0,6	0,07
	DC	7,2±0,4	6,8±0,4	0,16	7,5±0,6	6,8±0,4	0,06
	DT	7,5±0,1	7,7±0,8	0,54	8,5±0,1	7,7±0,8	0,07
Hematócrito (%)	NC	38,8±7,2	47,1±6,7	0,07	52,3±1,9	47,1±6,7	0,10
	NT	52,6±1,7	52,1±4,2	0,80	55,3±1,7	52,1±4,2	0,12
	DC	42,5±11,3	45,1±12,8	0,71	50,1±2,3	45,1±12,8	0,37
	DT	47,3±6,1	48,3±8,7	0,81	53,3±1,8	48,3±8,7	0,22

Em que: Var - Variáveis; Gp - Grupos; T₀ e T₈ - Antes do início do treino e oitava semana de treino; NC - Nutrido controle; NT - Nutrido treino; DC - Desnutrido controle; DT - desnutrido treino; Dados em média e desvio padrão; Teste t Student pareado e não pareado (p<0,05).

Tabela 4 - Produção de Óxido Nítrico por macrófagos alveolares intra e entre os grupos nutrido e desnutrido às fases do treino e ao estresse por contenção.

Estímulo	Grupos Experimentais			
	NT (V)	NC (V)	DT (V)	DC (V)
Com LPS (H)	30,91±3,70 ^{a, b}	16,38±4,15 ^a	25,44±1,78 ^{a, b, d}	16,92±3,83 ^a
Sem LPS (H)	14,48±4,10 ^c	9,93±4,97	15,03±3,73	10,87±5,03

Em que: NC – Nutrido controle; NT - Nutrido treino; DC - Desnutrido controle; DT - desnutrido treino; LPS - Lipopolissacarídeo; H - Análise horizontal; V - Análise vertical; Dados em média e desvio padrão; Teste t Student ($p < 0,05$); Diferenças após contenção: **a** - Com e sem LPS: intra-grupo (V); **b** - Com LPS: controle e treino (H); **c** - Sem LPS: controle e treino (H); **d** – Entre os grupos treinos com LPS (H).

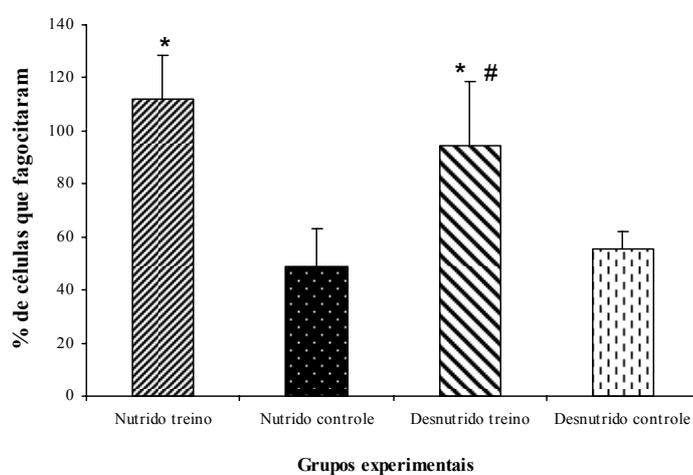


Figura 1 – Taxa de fagocitose liberada por macrófagos alveolares em ratos nutridos e desnutridos, após a realização do programa de TFM e estresse de contenção. Dados em média e desvio padrão. Teste t Student e ANOVA, com *pos hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$). * - Diferença entre grupos treinos e controles; # - Diferença entre um grupo treino e um controle (representação da comparação múltipla)

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo envolvendo a desnutrição neonatal, o sistema imune, o estresse e o treinamento físico moderado, criou novas perspectivas de trabalho para serem analisadas. Essas variáveis respondem de forma específica a determinados tipos de estímulos, entretanto, parecem atuar de forma bidirecional na modulação das que, naquele momento, são condicionantes. As respostas induzidas por essas relações nos permitem encaminhar novas propostas de trabalho, já que o interesse é identificar os possíveis limites ou pressupostos que indiquem a atuação de cada elemento e como essas interações ocorrem.

As respostas obtidas por cada variável durante a aplicação de um protocolo de treinamento físico moderado sugerem a busca do conhecimento acerca de sua cinética em função das fases do protocolo experimental. Essa proposta objetiva a construção de parâmetros que possam caracterizar pontualmente ou de forma intervalar, sua participação no fenômeno avaliado. Em função dos resultados obtidos, podemos propor novos trabalhos, a fim de estabelecer um referencial comparativo nas observações em seus níveis bioquímicos e imunológicos, as seguintes sugestões:

1 - Quanto a desnutrição:

a – Que as mães possam ser desnutridas antes da prenhe e essa condição seja mantida durante esse período, com recuperação nutricional na fase neonatal;

b – Que as mães possam ser desnutridas antes da prenhe e essa condição seja mantida durante todo o período de estudo;

c – Que as mães possam ser desnutridas na prenhe e essa condição seja mantida durante todo o período de estudo.

2 - Quanto ao Exercício físico:

a – Que a cria dessas mães possam ser submetidas ao treinamento físico moderado e intenso, em função de sua fase maturacional: jovens, adultos e idosos.

3 - Quanto ao estresse

a – De forma programada durante o processo, diferentes tipo de estímulos sejam aplicados aos grupos, tentando identificar as respostas em diferentes fases da vida com ou sem a realização do treinamento.

As propostas de novos estudos envolvendo a interação das variáveis trabalhadas têm o objetivo de minimizar as possibilidades de viéses nas conclusões alcançadas, criando a perspectiva de utilização futura, com suas devidas adaptações, em serem humanos. Esses modelos poderão auxiliar na determinação de eixos de estudos na área de saúde, a fim de que se possam atenuar as prováveis repercussões causadas pela resposta a um estado ou fase de desnutrição ou na aplicação inadequada de programas que envolvam o treinamento físico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo, C.F., Moraes, M.S., Diniz, A.P.S., Cosendey, A.E. Pseudoanemia dilucional e os atletas olímpicos. *RBAC*, vol. 36(4): 197-200, 2004.

Batista Filho, M., Rissin, A. **A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais.** *Cad. Saúde Pública* [online]. 2003, v. 19, suppl. 1, pp. S181-S191. ISSN 0102-311X.

Besedovsky, H.O. e A. Del Rey. Immune-neuro-endocrine interactions: Facuss and hypotheses. *Endocr Rev.* v.17.n.1, Feb, p.64-102.1996

Biorvel, H.R.S. Long term treatment of severe obesity: four year fallow-up results of combined behavioural modification programme, *BMJ*, v. 291, p. 379-82, 1985.

Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shephard RJ (1998). Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med* 10: 130-143.

Bricks, L.F. Ferro e infecções. *Atualização. Pediat. (S. Paulo)*, 16 (1): 34-43, 1994.

Castell L M e Newsholme E. A. Glutamine and the effects of exhaustive exercise upon the immune response. **Can. J. Physiol. Pharmacol** 1998; 76 (5): 524-532.

Chandra, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nut*, 1997; 66(2): 460S-463S.

Costa Rosa, L.F.P.B., Vaisberg, M.W. Influência do exercício na resposta imune. *Ver. Bras. Med. Esporte* v.8, n.4 - Jul/ago. 2002.

Da Cruz, A.M. Resistência aeróbia e eritropoetina. *Estudos, Goiânia*, v.33, n. 7/8, p. 553-572, Jul./Ago. 2006.

De Castro, C.B., Bureau, M.F.; Nahori, M.A.; Dumarey, C.H.; Vargaftig, B.B.; Bachelet, M. (1995). Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea-pi

De Castro CB., Manhães-de-Castro R, Medeiros AF, Queirós A, Ferreira WT, Lima Filho JL. (2000) Effect of stress on the production of O₂ - in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol.* 108 (1) 68-72.

Dias, R., Frolline, A.B., Prestes, J., Ferreira, C.K.O., Donatto, F.F., Verlengia, R., Palanch, A.C. Cavaglieri, C.R. Efeito do exercício agudo de curta duração em leucócitos circulantes e linfócitos teciduais de ratos. *Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.*, São Paulo, v.21, n.3, p.229-43, Jul./Set. 2007.

Gaillard RC . Neuroendocrine-Immune system interactions. The Immune-hypotalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endoc Metabol (TEM)* 7(5):303-309. 1994

Green, K.J.; Croaker, S.J., Rowbottom, D.G. Carbohydrate Supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v.95, n.1, p.57-63, 2003.

Gutierrez-Perez, J.L. Et al. Infecciones orofaciales de origem odontogênico. *Méd. Oral.*, S.1., v.9, p. 280-287,2004.

Hainline A Jr. (1958). *Standard methods of clinical chemistry*. New York: Academic Press.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. New York: Oxford, 1996.

Hennessy, L. C. and Watson, A. W. S.: The interference effects of training for strength and endurance simultaneously. *J. Strength Cond. Res.*, 8:12, 1994

Hoffman-Goetz L and Pedersen BK. Exercise and the immune system: a model of the stress response? **Imunol. Today** 1994;15(8): 382-387.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2000. *Projeção Preliminar da População do Brasil. Revisão 2000*. 20 Setembro 2002 <<http://www.ibge.gov.br>>.

Kim H, Shin S, Kim S, Lim B, Kim Y, Chung J, Kim H, Kim C (2003). Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague-Dawley rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 43: 99-104.

Koller, M.M. Purushotham, K.R. Maeda, N. SCARPACE, P.J. Humphreys-Beher, M.G. Desipramine induced changes in salivary proteins, cultivable oral microbiota and gingival health in aging female NIA Fischer 344 rats. *Life Sciences*, v. 68, p. 445-455, 2000b.

Kuwahira I, Kamiya U, Iwamoto T (1999). Splenic contraction- induced reversible increase in hemoglobin concentration in intermittent hypoxia. *J Appl Physiol*. 37: 399-420.

Landmann R, Muller FB, Perini CH, Wesp M, Erne P, Buhler FR. Changes of immuno-regulatory cells induced by psychological and physical stress: relation to catecholamines. **Clin. Exp. Immunol.** 1984; 58: 127-135.

Lapin, L.P, Prestes,J., Pereira, G.B, Palanch, A.C., Cavaglieri, C.R., Verlengia, R. Respostas metabólicas e hormonais ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Educação Física, Esporte, Lazer e Dança*, v. 2, n. 4, p. 115-124, dez. 2007.

Leandro, C. G. et al. O exercício físico e Sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Rev. Port. Ciências do Desp.* 2 (5): 80-90. 2002.

Leandro, C. G. Influência do treino de resistência moderado na resposta imunológica de ratos submetidos a contenção aguda. [Tese de Doutorado]. Portugal. Faculdade de Ciências do Desporto e de Educação Física – Universidade do Porto – 2005

Lima, D.A.; Soares, B.J.; Greco, J.B.; Galizzi, J.; Cangado, J.R. Métodos de laboratório aplicados à clínica-técnica e interpretação. 8ª ed. Ed. Guanabara Koogan; São Paulo, 2001.

Malagueño E, Albuquerque C, de Castro CMMB, Gadelha M, Irmão JI, Santana JV (1998). Effect of *Biomphalaria straminea* Plasma in the Phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* Hemolymph Cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 93(1): 301-302.

Moraska A, Deak T, Spencer R, Roth D, Fleshner M (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279: R1321-R1329.

Nascimento, E., Cavalcante, T., Pereira, S., Palmeira, A., Rocha, M.A., Viana, M.T., Manhães-de-Castro, R., De-Castro, C.M.M.B., Duarte, J., Leandro, C.G. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2004, vol. 4, nº 3 [26–33].

Nehlsen Cannarella SL, Cellular responses to moderate and heavy exercise. **Can J. Physiol Pharmacol.** 1998; 76 (5): 485-489.

Newsholme E A .Biochemical mechanism to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. **Int. J. Sports Med.** 1991; 15: (suppl 3): S142-S147.

Oliveira, E.M., Ramires, P.R., Lancha Júnior, A.H. Nutrição e Bioquímica do Exercício. *Rev. Paul. Educ. Fís.*, São Paulo, v. 18, p. 7-19, Ago. 2004, N.esp.

Papoti, M., Almeida, P.B.L., Prada, F.J.A., Eleno, T.G., Hermini, H.A., Gobatto, C.A., De Mello, M.A.R. Máxima fase estável de lactato durante a natação em ratos recuperados de desnutrição protéica. *Motriz*, Rio Claro, v.9, n.2, p.97 - 104 , mai./ago. 2003.

Paster, B.J. Boches, S.K. Galvin, J.L. Ericson, R.E. LAU, C.N. Levanos, V.A. Sahasrabudhe, A. De whirst, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*, v. 183, p. 3770-3783, 2001.

Pelczar Junior, M.J. Chan, E.C.S. Krieg, N.R., Flora Normal do corpo humano. In: *Microbiologia Conceitos e Aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron Books,1996. v. 2. cap. 17, p. 22-40.

Pereira, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. *Motriz – Volume 2*, Dezembro / 1996.

Leite, H.P., Sarni, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. *Rev. Bras.Nutr. Clin* 2003; 18(2):37-94

Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L. Exercise and the immune system regulation, integration and adaptation. *Psic. Rev.* 2000; 80 (3): 1055-1081.

Med. 32 (6): 361-369.

Picanço-Diniz, C.W., Borba, J.M.C., Rocha-de-Melo, A.P., Santos-Monteiro, J., Guedes, R.C.A. NADPH-diaphorase Histochemical labeling Patterns in the Hippocampal Neuropil and Visual Cortical Neurons in Weaned Rats Reared During Lactation on Different Litter Sizer. *Nutritional Neuroscience.* 2004; 7(4): 207-16.

Queiros-Santos, A. Desnutrição precoce e estresse agudo: aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. [dissertação de Mestrado]. Recife. Univ. Federal de Pernambuco, 2000.

Reeves, P.G. Nielsen, F.H. Fahey, G.C.J. 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. *Journal of Nutrition.* Urbana, Vol. 123 n. 11, pp. 1939-1951, 1993.

Santhiago, V., Da Silva, A.S.R., Gobatto, C.A., De Mello, M.A.R. Treinamento físico durante a recuperação nutricional não afeta o metabolismo muscular da glicose de ratos. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte - Vol.12. Nº 2 – Mar/Abr, 2006.*

Selye, H. *The Stress of life.* New York: McGraw Hill, 1956

Silva, M. P.; Stevanato, E.; Moreira, V.M.; Porto, M., Mello, M.A.R. Efeitos da desnutrição intra-uterina e da recuperação nutricional sobre respostas metabólicas ao exercício crônico em ratos jovens. **Motriz**, Rio Claro, v.5, p.152-9, 1999.

Stewart, I., McKenzie, D. (2002). The human spleen during physiological stress. *Sports Med.* 32 (6): 361-369.

Stibbe W, Weise M, Seidel, D. (1985). Automated platelet count in thrombocytopenic patients-a comparison of methods. *J Clin Chem Clin Biochem.* 23(7):399-404.

Touger-Decker, R. Nutrição para a saúde oral e dental. In: Mahan, L.K. Escott-Stump, S. Krause Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11th ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 637

Trudel, L. Amand, L.S. Bareil, M. Cardinal, P. Lavoie, M.C. Bacteriology of the oral cavity of the BALB/c mice. Canadian Journal of Microbiology, v. 32, p. 673-678, 1986.

Vicente, E.J. Apostila de aulas práticas. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Disciplina de Microbiologia. 2004

Wilkins, E.M. Odontologia geral: teoria e prática, 1 ed. São Paulo. Rideel, 2004.

9. ANEXOS

9.1 Anexo - I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 76/07 Recife, 14 de agosto de 2007

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**
Departamento de Nutrição - UFPE
Processo nº 008226/2007- 55

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 da desnutrição e do treinamento físico moderado sobre parâmetros imunológicos em ratos submetidos a estresse agudo de contenção”**.

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

Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

CCB: Integrar para desenvolver

9.2 Anexo – II

DOCUMENTO DE ENCAMINHAMENTO DO ARTIGO I

 **PUC**
CAMPINAS
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA

SOCIEDADE CAMPINEIRA DE EDUCAÇÃO E INSTRUÇÃO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI/CCV

REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAB ABSTRACT - EMBASE
FSTA - POPLINE - POP LINE - NISC - SCOPUS - WEB SCIENCE
BASES NACIONAIS: LILACS - SciELO - PERI-
QUALIS (CAPES) A-NACIONAL
ISSN 1415-5273

DECLARAÇÃO

Declaro para fins curriculares e atestado de atividades, que o Prof. *Marcelo Tavares Viana*, autor, enviou o artigo "**O efeito do treinamento físico moderado e da desnutrição precoce sobre a microbiota oral normal de ratos adultos**" para a Revista de Nutrição e se encontra em processo de avaliação.

Campinas, 6 de outubro de 2008


Prof. Dra. Semiramis Martins Álvares Domene
Editora Adjunta
Revista de Nutrição

CAMPUS II – Av. John B. Dunlop, s/n – Prédio de Odontologia - Jd. Ipaussurama - 13060-904 - Campinas - SP - Brasil. Fone/Fax 55 (19) 3343-6875
E-mail: ccv.revistas@puc-campinas.edu.br Web: <http://www.puc-campinas.edu.br/centro/ccv>

9.3 Anexo - III

DOCUMENTO DE ENCAMINHAMENTO DO ARTIGO II



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA
NÚCLEO DE EDITORAÇÃO SBI/CCV

REVISTA DE NUTRIÇÃO/BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION
INDEXADA EM BASES DE DADOS INTERNACIONAIS:
CHEMICAL ABSTRACT - CAB ABSTRACT - EMBASE
FSTA - POPLINE - POP LINE - NISC - SCOPUS - WEB SCIENCE
BASES NACIONAIS: LILACS - SCIELO - PERI -
QUALIS (CAPES) A NACIONAL
ISSN 1415-5273

Campinas, 22 de janeiro de 2009

CA/NE/RN nº 69/2009

Ilustríssimo Senhor

Venho pelo presente agradecer o envio do manuscrito **Adaptação leucocitária, hematimétrica e morfológica ao treinamento físico moderado de ratos desnutridos precocemente...** para publicação na Revista de Nutrição. Para toda a correspondência futura relativa a este trabalho, por favor, refira-se ao protocolo número **1899**.

O Conselho Editorial procederá a tramitação regular do processo de aprovação do manuscrito, entendendo que o mesmo não foi publicado anteriormente e que não será submetido a outro periódico durante o período de revisão.

Tão logo quanto possível, V.Sa será notificado(a) a respeito do processo para consideração de eventuais sugestões dos revisores ou sobre a aprovação do trabalho.

Informamos que a partir da submissão do manuscrito aos revisores técnicos, serão aceitas somente duas novas versões a partir do original.

Novamente grata por seu interesse na Revista de Nutrição, expresso nossas saudações.

É com muita alegria que comunicamos a indexação da Revista de Nutrição na base Scopus e Web of Science!

Atenciosamente

Maria Cristina Matoso
Revista de Nutrição
Editora Gerente

Ilustríssimo Senhor
Prof. Marcelo Tavares Viana