WILTON DARLEANS DOS SANTOS CUNHA

**INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO SOBRE A RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE RATOS DESNUTRIDOS**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Ciências (Biologia Celular e
Tecidual).

São Paulo

2009

WILTON DARLEANS DOS SANTOS CUNHA

INFLUÊNCIA DO EXERCÍCIO SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE RATOS
DESNUTRIDOS

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor
em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e
Tecidual.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Cerqueira
Leite Seelaender.

Co-orientador: Prof.Dr. Luis Fernando B.
Pereira Costa Rosa (*in memoriam*).

São Paulo

2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cunha, Wilton Darleans dos Santos.

Influência do exercício físico sobre a resposta imunológica de ratos desnutridos / Wilton Darleans dos Santos Cunha. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Marília Cerqueira Leite Seelaender.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Desnutrição, exercício, sistema imunológico.

Versão do título para o inglês: Influence on the physical exercise on the immunological response of undernourished rats.

Descritores: 1. Desnutrição 2. Exercício de intensidade moderada 3. Sistema imunológico 4. Timo 5. IL2 I. Seelaender, Marília Cerqueira Leite II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB088/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Wilton Darleans dos Santos Cunha.

Título da Tese: Influência do exercício físico sobre a resposta
imunológica de ratos desnutridos.

Orientador(a): Marília Cerqueira Leite Seelaender.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**À minha família, meus pais pela educação,
meus irmãos e minha cunhada pelo apoio,
minhas sobrinhas pela alegria, aos meus filhos
(atletas) pelo encanto de cada dia e a família
GG e Marília pelo acolhimento e amizade.**

Muito Obrigado!!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Mauro Vainsberg por ter me levado ao laboratório, serei sempre inteiramente grato, pela confiança depositada em mim e com essa tese tenha correspondido.

À Prof^a. Dr^a Maria Tereza Nunes e todo pessoal do laboratório Leonice (Lho) sempre atenciosa, Rosângela, Silvia, Kelly, Monica, Fran, as nutri girls e a Gisele como todas as suas companheiras de laboratório jamais se recusou a ajudar e por sua participação na minha banca de qualificação.

À Prof^a. Dr^a Edna Teruko Kimura e todo seu pessoal por disponibilizado seu laboratório, seu auxilio sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Anselmo Moriscot por ter disponibilizado o DEXA.

Ao Prof. Dr. Rui e todos seus alunos por sempre ter deixado disponível seu laboratório e sempre se prontificado a esclarecer-me qualquer duvida.

Ao Prof. Dr. Luiz G. Brito por ser uma pessoa sempre solícita e bem humorado, bem como pelos seus incentivos.

À Prof. Dr^a. Alison Colquhoun pelos ensinamentos, cafés e pela sua participação na minha banca de qualificação e todos seus alunos.

À Prof. Dr^a Marínilce e seus alunos, Marcelo, Mara, Virginia, Tita por nossas conversas trocas de informações.

Ao Prof. Dr. José Roberto sempre de bom humor e disposto a ajudar.

Ao Prof. Dr. Emer e Dr^a Andréia pela amizade e respeito que tenho, por seu encorajamento depois de uns tempos difíceis depois da perda de um grande amigo e mentor, por ter sempre deixado as portas abertas do seu laboratório e sala, e por nossos bate-papos ao final do dia.

Ao Dr. Wilson Savino primeiro por ter sido uma pessoa bem gentil e solícita, sempre ajudando e encorajando o meu trabalho, bem como todo pessoal do seu laboratório que nunca deixaram de auxiliarem quando foi preciso.

Ao Ronaldinho um exemplo de amizade e confiança no meu esforço e por ser a pessoa que mais entende de futebol ser ir ao botequim.

Ao Erico e família por ser um amigo sempre disponível, ao qual alternamos conversas sérias e engraçadas.

Ao Eivor, Bia, Joãozinho e Catarina por me acolherem no laboratório e como uma pessoa da família.

À Ana Carolina, Rodrigo e Bruno pela amizade e respeito.

Ao pessoal da velha guarda do laboratório, Frank, Navarro, Andréia, Tubarão, Aline, Uchida, Miguel.

Ao pessoal da nova geração Anniele, Fernanda, Cida, Daniel, Helio, Leo, Natalia.

Ao pessoal do laboratório de lípidos Melissa, André terrinha, Flavia, Priscila, Danniela, Luiz, Robson, Michel, Waldecir.

Ao pessoal do biotério Nanci, Santinha, Ivonete e Claudio pelos cuidados com os animais, pela conversas e cafés alegres que sempre tivemos.

Ao Robertão que convivi pouco tempo, mas incomparáveis conversas e cafés, Gerson por nossas cervejas no fim de semana infelizmente partiram deixando um grande vazio no ICB e a Emília que traz alegria por me lembrar sempre deles e também da minha história na USP.

À Cely secretaria da Pos- Graduação que sempre solicita e sempre com uma resposta para nos ajudar, Elô e Beth secretarias do departamento de Biologia celular e Desenvolvimento sempre nos atendendo com gentileza.

Ao pessoal da biblioteca, que nunca deixaram de me ajudar Edmilson (Bolinha), Paulo (Nelsinho), Renata, Ana Paula e todos sem exceção.

À Nova geração de cientista Fio um ótimo amigo e mão na massa, Zeca teve a quem puxar Nelo empreendedor sempre e meu filho Alex que não tenho palavras para agradecer e nem expressar de minha satisfação de chamá-lo assim, a vocês muito obrigado.

Aos meus atletas, Luna, Caroline, Elen, Tatiane, Rafael, Hewelin, Carlinhos, Milena, Drica pela compreensão de minha condição.

À Claudia, Lucia, Alex, e toda sua família por ter-me acolhido no seu seio.

À Patrícia Neves uma fonte inspiradora e encorajadora.

À Vanessa pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos.

E por fim agradecer de coração a Família GG e Marília um exemplo de amizade e respeito, e o GG por ensinar a conviver numa sociedade comuno-anarco-sindicalista, Muito Obrigado, mesmo!

“De todas as absurdas suposições da humanidade, nada excede as críticas feitas aos hábitos dos pobres feitas pelos que têm boa moradia, estão bem aquecidos e bem alimentados”. *Herman Melville.*

Nada é permanente neste mundo perverso, nem mesmo nossos problemas. *Charles Chaplin.*

RESUMO

DOS SANTOS CUNHA, W.D. **Influência do exercício físico sobre as respostas imunológicas de ratos desnutridos.** 2009. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A desnutrição é capaz de induzir diversas alterações metabólicas afetando marcadamente a composição corporal e o sistema imunológico. O exercício físico, por sua vez, produz alterações no organismo para uma melhor capacidade de adaptação a situações de estresse. O desvio da situação de homeostase produzida pelo exercício físico induz uma reorganização de seus mecanismos funcionais, principalmente dos mecanismos endócrinos e imunológicos. Ainda é pouco conhecida a influência do exercício sobre a desnutrição e também as consequências sobre o sistema imunológico quando as duas variáveis são combinadas. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico de *endurance* sobre ratos submetidos a um protocolo de desnutrição crônica. Avaliamos ratos Wistar machos, desnutridos por 16 semanas, divididos em 4 grupos: eutrófico sedentário (ES), eutrófico treinado (ET), desnutrido sedentário (DS), desnutrido treinado (DT). O treinamento físico foi realizado em esteira, por 10 semanas, 5 vezes por semana, com intensidade aproximada de 60-65% do consumo máximo de oxigênio. Avaliou-se a composição corporal, através da aferição do peso corporal, peso dos tecidos muscular esquelético e adiposo, do fígado, do conteúdo de gordura e proteína na carcaça, e a concentração de leptina, ACTH, glicose, insulina, e glutamina no plasma. Avaliamos também, através de citometria de fluxo, os marcadores de superfície celular CD3 e CD4, bem como a celularidade no timo. O consumo máximo de oxigênio e o desempenho através de um teste até a exaustão também foram analisados. A análise estatística utilizada foi o teste de variância ANOVA *two-way* com pós teste de Bonferroni e, nível de significância adotado de $p < 0,05$. Os resultados encontrados demonstraram que o treinamento de *endurance* em ratos submetidos à desnutrição crônica promoveu uma acentuada redução do peso e da adiposidade corporal; um aumento da massa muscular relativa ao peso corporal; um restabelecimento da glicemia aos valores normais; uma melhor relação da concentração insulina/glicose, sugerindo uma sensibilidade à insulina aumentada; um aumento dos estoques de glicogênio muscular; um maior consumo máximo de oxigênio; e uma recuperação na morfologia e fisiologia tímica, uma maior resposta proliferativa do baço e linfonodos estimulados com IL2. Concluímos desta forma que o exercício foi capaz de recuperar a morfologia, como também a maturação timócitos CD3 e

CD4 e sua celularidade em ratos desnutridos. A resposta proliferativa à estimulação da IL2 também foi recuperada.

Palavras-chave: Desnutrição; Treinamento Físico de Intensidade Moderada; Sistema Imunológico; Timo e IL2.

ABSTRACT

DOS SANTOS CUNHA, W.D. **Influence of moderate intensity physical training exercise on the immune response of malnourished rats.** 2009. 139 p. Thesis - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

Malnutrition is capable of inducing diverse metabolic alterations, markedly affecting body composition and the immune system. Physical exercise, on the other hand, induces a renders the organism more capable of adaptation to stress. Still, little is known about the influence of exercise training upon malnutrition-related alterations and its consequences on the immune system. Our aim was to evaluate the effect of moderate intensity exercise training in rats submitted to a protocol (16wk) of chronic malnutrition. Male Wistar rats were divided in to 4 groups: sedentary, fed *ad libitum* (SF); trained fed *ad libitum* (TF); sedentary energy restricted (RES); and trained energy restricted (TER). Training was carried out on a treadmill for 10 weeks, 5 time wk, under an intensity of 60-65% of the maximal oxygen consumption. We evaluated the Corporal composition, the variation of body weight, and the weight of the skeletal muscle, adipose tissues, and liver; as well as fat and protein content in the carcass; and also plasma leptin, ACTH, glucose, insulin and glutamine concentration. We also examined through flow cytometry CD3 and CD4, as well as the celularity in the thymus. The maximum consumption of oxygen and the performance were also assessed. The results demonstrate that endurance training in rats submitted to the chronic malnutrition protocol promoted reduction of body weight and of corporal adiposity; an increase in the relative contribution of muscle to body weight; the reestablishment of glicemia; improval of insulin/glucose reason, suggesting increased sensitivy to insulin; an increase of muscle glycogen content; enhanced oxygen consumption; are recovery of the morphology and physiology of the thymus, together with a proliferative response of the spleen and lymph nodes stimulated with IL2. We conclude in such a way that moderate intensity training restored thymus morphology and the capacity of maturation of CD3 and CD4 and also timocyte number and the of proliferative response to IL2 stimulation.

Keywords: Malnutrition; Moderate intensy exercise training; Immune System; Thymus and IL2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organograma do delineamento do estudo.....	39
Figura 2. Progressão de peso corporal durante o período experimental.	52
Figura 3. Ganho de massa corporal durante o período experimental.	53
Figura 4. Diferença de tamanho dos animais a esquerda um rato desnutrido a direita o rato eutrófico.....	54
Figura 5. Progressão de a ingestão alimentar durante o período experimental.....	55
Figura 6. Progressão de a ingestão alimentar durante o período experimental.....	56
Figura 7. Peso absoluto (g) dos músculos sóleos, extensor digitório longo (EDL).	58
Figura 8. Peso relativo (% - porcentagem do peso corporal total) dos músculos sóleos, extensor digitório longo (EDL).....	59
Figura 9. Peso absoluto do timo.	60
Figura 10. Peso relativo (%- porcentagem do peso corporal) do timo.	61
Figura 11. Peso absoluto (g) dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (TARP), epididimal (TAE).....	62
Figura 12. Peso relativo (% - porcentagem do peso corporal total) dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (TARP), epididimal (TAE).....	63

Figura 13. Composição corporal da carcaça (%).....	65
Figura 14. Análise da massa magra através do DEXA.....	66
Figura 15. Análise da massa gorda através do DEXA.....	67
Figura 16. Tempo até a exaustão, em minutos (min.).....	69
Figura 17. Velocidade de exaustão (m/min.).	70
Figura 18. $VO_{2máx}$ (ml/kg/min.) realizado antes do período de treinamento. Dos.	71
Figura 19. $VO_{2máx}$ (ml/kg/min.) realizado após o período de 10 semanas de treinamento.	72
Figura 20. Citometria de CD3 do Timo.	73
Figura 21. Citometria de CD4 do Timo.	74
Figura 22. Celularidade do Timo.....	75
Figura 23. Proliferação das células do baço sem adição de mitógeno.....	77
Figura 24. Proliferação das células do baço com adição de ConA.....	78
Figura 25. Proliferação das células do baço com adição de LPS.	79
Figura 26. Proliferação das células do baço com adição de IL2.	80

Figura 27. Proliferação das células dos linfonodos sem adição de mitógeno.	82
Figura 28. Proliferação das células dos linfonodos com adição de LPS.	83
Figura 29. Proliferação das células dos linfonodos com adição de ConA.	84
Figura 30. Proliferação das células dos linfonodos com adição de IL2.	85
Figura 31. Concentração de glicose.	87
Figura 32. Concentração de insulina.	88
Figura 33. Relação insulina/glicose ([insulina] (μ UI/ml) / [glicose] (mg/dl)).	89
Figura 34. Concentração de leptina.	90
Figura 35. Concentração de glutamato.	91
Figura 36. Concentração de glutamina.	92
Figura 37. Concentração de ACTH.	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Protocolo de treinamento em esteira ergométrica..... 41

TABELA 2 - Protocolo de teste de desempenho e de $VO_{2máx}$ 42

ABREVIATURAS

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico

ADP: adenosina difosfato

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenosina trifosfato

BDM: densidade de massa corporal

BSA: albumina sérica bovina

CPM- contagem por minuto

DEPC: dietilpirocarbonato

DS: grupo de animais – desnutrido sedentário

DT: grupo de animais – desnutrido treinado

ECM- matriz extracelular

EDL: músculo extensor digitário longo

ES: grupo de animais – eutrófico sedentário

ET: grupo de animais – eutrófico treinado

GDH: glutamina desidrogenase

IFN – γ - interferon gama

IL 2- interleucina 2

IMP: iosina monofosfato

LDH: lactato desidrogenase

LFA- linfócito de função associada a antígeno

MHC- complexo de maior histocompatibilidade

NK- células natural killer

NSB- ligação não específica

PCR: reação da cadeia de polimerase

PFK: fosfofrutocinase

RNA_{tot}: RNA total

RPL19: proteína ribossomal 19

RT-PCR: transcrição reversa da reação da cadeia de polimerase

TAE: tecido adiposo epididimal

TAME: tecido adiposo mesentérico

TARP: tecido adiposo retroperitoneal

TCR- receptores de células T

TEC- células epiteliais tímica

TNC- células nurse do timo

TNF- fator de necrose tumoral

VO_{2máx}: consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Justificativa.....	23
1.2 Objetivo.	24
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 A desnutrição.....	25
2.2 Desnutrição e sistema imunológico.....	26
2.3 Timo.....	27
2.3.1 O timo na desnutrição.	29
2.4 Desnutrição e órgãos linfóides secundários.....	30
2.5 Exercício e sistema imunológico.	31
2.5.1 Exercício agudo e sistema imunológico.	32
2.5.2 Exercício crônico e sistema imunológico.	34
2.6 Desnutrição, exercício e sistema imunológico.	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.	38
3.1 Animais.....	38
3.2 Protocolo da Desnutrição.....	38
3.3 Subdivisão dos grupos experimentais.....	38
3.4 Determinação do consumo oxigênio (VO_{2max}).....	40
3.5 Teste de exaustão (T.E.).....	40
3.6 Protocolo do Treinamento.	40
3.7 Análise por DEXA (DUAL-Energy X – Ray Absormetry).....	42
3.8 Conteúdo de lípidos na carcaça.	43
3.9 Determinação da concentração de proteína nas amostras.....	43
3.10 Parâmetros imunológicos.....	46
3.10.1 Organização histológica do timo e a rede epitelial tímica.....	44
3.10.2 Celuridade de subpopulações de timócitos.....	44
3.10.3 Resposta proliferativa dos Linfonodos e Baço.	45
3.10.4 Expressão gênica do RNAm da Enzima Glutamina Sintetase.....	46
3.11.1 Radioimunoensaio (RIE) para ACTH.....	47
3.11.2 Radioimunoensaio (RIE) para leptina.....	47
3.11.3 - Determinação das concentrações da glutamina plasmática.	48

3.11.4	Determinação das concentrações glutamato plasmático.....	49
3.11.5	Dosagem das concentrações glicose plasmática.	49
3.11.6	Dosagem das concentrações insulina plasmática.....	49
3.11.7	Índice glicose/Insulina.	50
3.12	Análise dos resultados.	50
4	RESULTADOS.	51
4.1	Caracterização da desnutrição.	51
4.1.1	Progressão do peso corporal.	53
4.1.2	Progressão da ingestão alimentar.	54
4.1.3	Peso dos tecidos.	57
4.1.4	Tempo até a exaustão.	68
4.1.4.2	Velocidade atingida na exaustão.	70
4.1.4.3	Consumo máximo de Oxigênio (VO_{2max}).	71
4.2	Parâmetros imunológicos.....	73
4.2.1	Caracterização morfológica do timo.....	73
4.3	Parâmetros metabólicos.....	86
5	DISCUSSÃO.	94
5.1	Desnutrição.....	94
5.2	Efeito do exercício.	104
6	CONCLUSÃO.....	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	111

1 INTRODUÇÃO

A desnutrição ainda é o maior flagelo das populações de países em desenvolvimento, pelo fato de grande parte deles encontrarem assolados por catástrofes ou em guerras internas, ocasionando diversos problemas, principalmente de saúde pública (CAMPANA, 1985; WHR, 1997).

Chegamos ao século XXI ainda enfrentando esse problema, que influencia em muito a qualidade de vida de uma quantidade considerável de indivíduos em todo planeta (WHR, 1997; WHR, 2007). Dez anos se passaram entre o relato da Organização Mundial de Saúde em 1997 e a atual preocupação não somente focada na expectativa de vida do indivíduo, mas na expectativa de saúde, ou seja, expectativa de vida com boa saúde ou uma média de quantos anos um indivíduo vive em boas condições de saúde e higiene (WHR, 1997).

Relatos sobre desnutrição não são recentes, um exemplo é que a caquexia foi descrita há pelo menos 2000 anos (SEELAENDER, 1994). Contudo, tais relatos ligam, a partir do início do século XX (TRUE, 1915), o estado de desnutrição a algumas doenças, muitas vezes a guerras e escassez de chuvas (RUTHERFURD, 1921; PETERS et al., 1927) entre outros fatores.

Até 1930 só se tinha conhecimento da forma marasmática de desnutrição, na qual o indivíduo fica muito magro e desidratado, suscetível a doenças e sem disposição para realizar qualquer atividade; quando em 1948 foi feito o primeiro relato de uma forma edematosa como a síndrome de Kwashiorkor (ALTMANN, 1948), voltou-se a atenção aos aspectos clínicos e laboratoriais (CAMPANA, 1985). O relato de Kwashiorkor foi reconhecido como uma forma mais severa de desnutrição protéico-calórica, induzindo, além dos sintomas da desnutrição marasmática, despigmentação da pele e a distensão do abdômen (HEIMBURGUER e MORGAN, 2003).

A desnutrição protéico-calórica é reconhecida como causa importante de imunodepressão e imunossupressão, acometendo grande número de indivíduos, principalmente crianças em países subdesenvolvidos, onde é responsável por mais de 50% das mortes em crianças com menos de 5 anos (MACCARTER et al., 1998). Em países industrializados também são descritos casos de desnutrição, porém com maior acometimento de idosos (REDMOND et al., 1991b, REDMOND et al., 1991c). A relação entre estado nutricional e incidência de infecções do trato respiratório superior foi e ainda é demonstrada

em inúmeros estudos epidemiológicos (ZAMAN et al., 1996), sendo mesmo aceito que, apesar do advento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, a desnutrição protéico-calórica ainda seja a principal causa de imunossupressão e imunodepressão no mundo (REDMOND et al., 1995).

Uma das formas de expressão da relação desnutrição e sistema imunológico amplamente descrita se baseia em alterações observadas em componentes estruturais do sistema imunológico, como o timo (MCMURRAY, 1984, BARONE et al., 1993). Embora as relações entre desnutrição e timo datem de 1810, quando Menkel detectou ser o timo responsivo à desnutrição, a ponto do órgão ser considerado um “barômetro” da condição, por Simon, em 1845 (PRENTICE, 1999), somente há pouco mais de 4 décadas foi descoberta sua função imunológica, e só mais recentemente estudos relacionando estrutura e função tímica foram conduzidas (BARONE et al., 1993; LYRA et al., 1993; HOWARD et al., 1999; MCDADE et al., 2001).

Está bem estabelecido que a deficiência nutricional é comumente associada à redução das respostas imunológicas, particularmente da imunidade celular, sendo a desnutrição aceita amplamente como uma causa de imunodeficiência (CHANDRA, 1999).

Recentemente surgiram estudos tentando esclarecer como o exercício poderia atuar de forma preventiva e terapêutica no tratamento de varias condições patofisiológicas como doenças cardiovasculares e câncer (LANGESTEIN e NORTON, 1991; LANGHANS, 2002), ocasionando uma importante abertura de novos campos de estudos em outras condições patológicas como diabetes, patologias neurais e nutricionais como anorexia e desnutrição (COSTA ROSA, 2004).

Nosso grupo mostrou que o exercício pode reverter alguns aspectos que levam a imunossupressão relacionada à desnutrição crônica. Dessa forma, levando-se em conta que exercício físico tem reflexos em todos os tecidos e sistemas do corpo humano, sua prática abre a possibilidade de uma estratégia complementar de tratamento com melhora da qualidade de vida e de custos reduzidos em saúde pública (COSTA ROSA, 2004).

1.1 Justificativa

A desnutrição é reconhecida como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (WHR, 1997, 2007). Sabe-se, que a desnutrição resulta em uma diminuição da atividade do sistema imunológico causando imunossupressão e imunodepressão, os quais acometem crianças e adultos.

Nosso grupo mostrou uma recuperação em parâmetros funcionais do sistema imunológico, como a estrutura tímica e a produção de citocinas de respostas tipo Th₁(T Helper1) em animais desnutridos por 10 semanas sob um programa de exercício moderado (CUNHA et al., 2004). Poucas informações existem sobre os efeitos do exercício sobre a fisiologia tímica na desnutrição e sua atuação no povoamento nos órgãos linfóides periféricos através da responsividade à IL2.

1.2 Objetivo

Avaliar a influência do exercício físico, de intensidade moderada, sobre a estrutura e funcionalidade tímica, parâmetros metabólicos e de funcionais de células do sistema imunológico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A desnutrição

O quadro de desnutrição é um estado fisiológico que aparece quando as necessidades orgânicas de proteínas e energia, ou ambas, não são satisfeitas pela dieta, ocasionando amplas manifestações, como perda de peso e atraso no crescimento, primeiras alterações detectáveis em crianças e em animais durante a fase de vida pré-amadurecimento sexual. Além disso, a associação do déficit calórico-protéico com menor ingestão de nutrientes específicos induz quadro de imunoincompetência, com aumento significativo das doenças infecciosas (HOFFER, 1994).

Em termos populacionais, a desnutrição protéico-calórica pode afetar todos os grupos etários, mas sua ocorrência é maior e mais facilmente detectável em crianças e jovens. Nestas populações a ocorrência de desnutrição está associada à dificuldade de obtenção de alimento por seus próprios meios, associada com à pouca higiene, o que aumenta a incidência de diarreia e outras infecções. Em função dos altos custos relacionados ao tratamento das infecções secundárias ao quadro de desnutrição, existe, por parte de pesquisadores dos países desenvolvidos, grande interesse em se desenvolver fórmulas nutricionais baratas, acessíveis e eficientes para se reduzir a desnutrição infantil (CAMPANA, 1985).

Os primeiros relatos de “síndromes” associadas à desnutrição protéico-calórica datam da década de 30, quando foi descrita a KWASHIORKOR, uma forma edematosa da doença mais freqüente depois de 18 meses de idade, uma vez que até então só se conhecia a forma marasmática da desnutrição (CAMPANA, 1985).

O desenvolvimento gradual do quadro de desnutrição pode ocorrer em semanas ou meses, período no qual ocorrem ajustes metabólicos e comportamentais que resultam numa adequação do metabolismo basal à nova demanda energética. Estas alterações incluem ajustes na secreção de hormônios, assim como na fisiologia celular (LONGSTREET e KEYS, 1950; YOUNG e SCRIMSHAW, 1971; HOFFER, 2001).

Uma queda na ingestão de energia é rapidamente seguida por uma queda no gasto energético, alcançado, inclusive, por um aumento significativo nos períodos de repouso/baixa atividade e redução considerável do período de atividade, podendo comprometer o aprendizado e as atividades sociais da criança (MONTEIRO 1984; ANJOS, 1988).

Com a manutenção do estado de privação alimentar ou de desnutrição, só a redução no gasto energético não é mais suficiente para reequilibrar o metabolismo intermediário. Nesta fase têm início as alterações no metabolismo de gordura e proteínas, que levam a uma rápida perda de peso e degradação progressiva dos estoques protéicos (EMERY, 2005). A degradação protéica tem como objetivo primário suprir o fígado de substratos neoglicogênicos, para manutenção da glicemia. O alto custo energético do processo, no entanto, aumenta a necessidade de síntese de ATP a partir da oxidação de ácidos graxos, notadamente aqueles de cadeia longa, alimentando, positivamente, o ciclo de degradação de substratos e perda de massa. O catabolismo protéico leva a perda muscular, com comprometimento da função visceral e redução do consumo de O₂ (YOUNG e SCRIMSHAW, 1971, SHETTY, 1999; CARBONNEL, 2000; EMERY, 2005).

2.2 Desnutrição e sistema imunológico

O sistema imunológico é constituído por células isoladas ou organizadas em estruturas que se distribuem por todo o corpo; este sistema defende o organismo contra microrganismos e moléculas estranhas, como as toxinas produzidas por microrganismos invasores. Suas células são capazes de distinguir moléculas que são próprias do corpo das moléculas estranhas, quer estejam isoladas ou associadas à outra estrutura, como vírus, bactérias, fungos ou células malignas.

O sistema imunológico é formado por estruturas individualizadas, que incluem os órgãos linfóides primários como a medula óssea e o timo, os quais produzem os componentes celulares do sistema imunológicos como linfócitos, macrófagos e órgãos linfóides secundários onde encontramos os linfonodos, baço, tonsilas e placas de Peyer (GLEESON, 2000; NIEMAN; 2000; CHINEN e SHEARER, 2004).

Entre os órgãos linfóides, o timo tem um papel importante na diferenciação dos precursores de células T, levando à migração de timócitos positivamente selecionados aos órgãos linfóides periféricos (COOPER et al., 1967; NEZELOF, 1992; HAYNE et al., 2000; SAVINO e DARDENE, 2000).

2.3 O timo

O timo é um órgão linfóide primário, no qual células precursoras derivadas da medula óssea passam por um complexo processo de diferenciação envolvendo a expressão sequencial de várias proteínas de membrana e o rearranjo dos genes que codificam os chamados receptores de célula T (TCR), cujo produto final interage com proteínas codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), expressos em células do microambiente tímico (CHINEN e SHEARER, 2004; VIRTIS et al., 2006).

O órgão, localizado no mediastino anterior, é dividido em dois lobos, parcialmente subdividido em lóbulos por septos que contêm vasos e inervação. Cada lóbulo apresenta regiões claramente distintas: o córtex, região densamente povoada por linfócitos em contato íntimo com prolongamentos de células do microambiente, e a medula, menos densa em linfócitos, onde a concentração de elementos microambientais é proporcionalmente maior que no córtex (Savino e Dardene, 2000).

O microambiente tímico, crucial na diferenciação intratímica dos linfócitos T, é uma rede tridimensional composta de células epiteliais (TEC), células dendríticas, fagócitos, e fibroblastos, além de componentes da matriz extracelular. Como resultado de tais interações, o microambiente tímico fornece sinais para o desenvolvimento dos timócitos, os quais podem proliferar sofrer diferenciação ou apoptose (BARNARD et al., 2008).

O epitélio tímico é o principal componente do microambiente tímico e tem uma influência pleiotrópica nos eventos iniciais de diferenciação das células T, incluindo as interações envolvendo os produtos dos genes do MHC de classe I e classe II (expressos pelas células do microambiente tímico) com o TCR existente nas membranas positivas dos timócitos em diferenciação.

Esta interação determina o tipo de seleção, positiva ou negativa nos timócitos, seleção esta que está relacionada aos rearranjos gênicos do TCR e à afinidade deste TCR aos peptídeos apresentados pelo MHC. Timócitos com rearranjo gênico de TCR não-produtivo (isto é, cuja molécula formada não alcança a membrana plasmática) morrem por apoptose. Aqueles que apresentam interação TCR/MHC com alta afinidade/avidez também morrerão por apoptose, no fenômeno denominado seleção negativa, e mediado principalmente por células dendríticas (LYRA et al., 1993; HADDEN, 1992; SAVINO, 2007)

Por outro lado, os timócitos positivamente selecionados irão migrar do timo, indo colonizar regiões específicas nos órgãos linfóides periféricos. Nestes locais, os linfócitos T maduros poderão proliferar em resposta a um determinado estímulo antigênico, e em seguida migrar para sítios onde irão exercer sua atividade efetora revisão Savino, 2007.

As TEC também são capazes de influenciar a proliferação, seleção e migração intratímica de células T, através da produção de substâncias solúveis como interleucinas (IL) tais como IL-1, IL-3, IL-6 e IL-7 entre outras, várias quimiocinas, como, por exemplo, CXCL12, CCL21 e CCL25, e hormônios tímicos como a timulina, e ainda por contato célula-célula, mediados por moléculas de adesão, assim como moléculas de ECM e seus receptores (TAUB e LONGO, 2005).

Cabe ainda comentar que o epitélio tímico é um tecido heterogêneo, com células morfológica e fenotipicamente diferentes no córtex e medula dos lóbulos tímicos. Em particular, destacamos as chamadas células *nurse* do timo (TNC), complexos linfoepiteliais localizados na região mais externa do córtex, e nos quais uma célula epitelial é capaz de albergar um número variado de timócitos (principalmente imaturos), que proliferam, morrem, e transitam nestes complexos. Nesse sentido, as TNCs podem ser usadas como modelos *ex-vivo* para o estudo da diferenciação e migração de timócitos no contexto de uma célula epitelial (VILLA-VERDE et al., 1993; VIRTIS et al., 2006).

O processo de diferenciação intratímica ocorre à medida que os timócitos migram do córtex para a medula dos lóbulos tímicos, através de interações com o microambiente tímico. As células mais imaturas, localizadas no córtex mais externo do lóbulo tímico, são denominadas células duplo-negativas por não expressarem as moléculas CD4 e CD8 em sua superfície. Essas células migram para o córtex onde passam por vários ciclos de proliferação na região

subcapsular. À medida que migram pelo córtex as células $CD4^-CD8^-$ passam a expressar simultaneamente as moléculas CD4 e CD8, sendo então denominadas duplo-positivas $CD4^+CD8^+$ (CHINEN e SHEARER; 2004). Estas ocupam praticamente todo o córtex e constituem a maioria dos timócitos presentes no órgão, cerca de 80%. É neste estágio que termina o rearranjo dos genes de TCR, que na membrana plasmática, estará acoplado a um complexo macromolecular denominado CD3. Os timócitos $CD4^+CD8^+$ selecionados positivamente passam a expressar somente um dos marcadores, CD4 ou CD8 em suas membranas, tornando-se assim células maduras, simples positivas, e que correspondem a 15% dos timócitos totais, localizados na medula dos lóbulos tímicos, e que poderão deixar o órgão, gerando praticamente todo o chamado repertório de células T da periferia do sistema imune (LYRA et al. 1993; SAVINO e DARDENE, 2000; CHINEN et al., 2006).

A migração intratímica de linfócitos T parece ocorrer de forma ordenada da região cortical para a região medular do timo, sendo que este tráfego celular depende diretamente da expressão de moléculas ligantes e receptores de matriz extracelular, e também de substâncias quimiotáticas, que estariam, em conjunto, gerando um vetor resultante de migração orientada (SAVINO et al., 2000, 2002).

Por outro lado, cabe aqui frisar que o processo de diferenciação/migração intratímica de linfócitos T pode ser influenciado por substâncias endógenas, como por exemplo, hormônios e neuropeptídeos (BARNARD et al., 2008), e ainda por estímulos exógenos, tais como agentes infecciosos e desnutrição (SAVINO, 2002; SAVINO et al., 2004; BARNARD, 2008).

2.3.1 O timo na desnutrição

Conforme mencionado acima, uma das características mais marcantes de acometimento tímico na desnutrição é uma severa atrofia tímica, com depleção preferencial de timócitos corticais de fenótipos $CD4^+CD8^+$ (SAVINO, 2002). Tal fenômeno, não só é observado em desnutrição protéico-calórica, mas também em deficiências específicas de nutrientes tais como zinco, magnésio e ferro, ou vitaminas (KUVIBIDILA et al., 1990; DHUR et al., 1991; MALPUECH-BRUGERE et al., 1999; NODERA et al., 2001).

Além do aumento de morte, há também uma diminuição de proliferação nos timócitos de seres humanos (MITSUMORI et al., 1996), indicando que a depleção global de timócitos na desnutrição seja o somatório de aumento de morte celular e diminuição de proliferação.

Por outro lado, é possível que a atrofia tímica observada em situações de malnutrição se deva a um desequilíbrio hormonal, com aumento de hormônios glicocorticóides e diminuição de leptina (HOWARD et al., 1999; QUAGLINO e RONCHETTI, 2001.).

A desnutrição também afeta o compartimento microambiental do timo, com alterações estruturais no componente epitelial, diminuição de secreção hormonal por estas células e aumento de matriz extracelular (LYRA et al. 1993). No entanto, nada se sabe sobre alterações na produção de quimiocinas, assim como numa eventual alteração de capacidade migratória dos timócitos (SAVINO, 2007). Também não sabemos se há mudança nos níveis de expressão de receptores de membrana envolvidos na migração de timócitos.

2.4 Desnutrição e órgãos linfóides secundários

Conforme mencionamos acima, estudos referentes à imunidade celular em desnutridos constatarem importantes atrofia tímica, com perda da diferenciação córtico-medular (WATTS, 1969) e ainda alteração nas áreas timo-dependentes dos órgãos linfóides secundários (CHANDRA, 1992; FLÓ et al., 1996; BARNARD et al., 2008). Foi também relatada depressão da resposta imune cutânea em testes de hipersensibilidade tardia (CHANDRA, 1997; LANDGRAF et al., 2008), redução do número absoluto de linfócitos T no sangue periférico e diminuição da resposta proliferativa desta população de linfócitos em cultura (SCHAIBLE e KAUFFMAN, 2007). Além disso, a proporção de linfócitos T auxiliares/indutores (CD4⁺) apresentou-se reduzida, com pouca alteração na subpopulação de células T supressoras/citotóxicas CD8⁺ (CHANDRA, 1997; CHATRAW et al., 2008).

A diminuição na apresentação de antígenos para linfócitos T (MCCARTER, 1998; FOK et al., 2007) tem sido relacionada ao aumento na incidência de infecções, quando se observa, também, deficiência na função macrofágica (MCCARTER et al., 1998; CORTEZ-BARBARENA

et al. 2008), sendo relatadas várias alterações funcionais neste tipo celular, tais como diminuição de fagocitose (REDMOND et al., 1995; VASQUEZ-GARIBAY et al., 2004), de capacidade microbicida (REDMOND et al. 1991a; NIIYA et al., 2007), produção do ânion superóxido (REDMOND et al. 1991a; WALRAND et al., 2001), produção de citocinas (REDMOND et al., 1995; CEDEHOLM e GILLENHAMMAR, 1999) e expressão da molécula de classe II do MHC (COZEN e JANEWAY, 1988; REDMOND, 1995; ZHANG, 2005).

Foi descrita reduzida capacidade de produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α (REDMOND et al., 1995; CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 2005) e IFN- γ (DOHERTY et al. 1994; CALDER e KEW, 2002; RODRIGUEZ et al., 2005). Estes dados, no entanto, foram obtidos em amostras de indivíduos desnutridos que incluíam aqueles portadores de algum tipo de infecção, podendo este fato explicar a discrepância em relação aos outros resultados descritos.

Embora exista quase um consenso com relação à deficiência na produção de IL-1 por células apresentadoras de antígeno em indivíduos desnutridos (REDMOND et al., 1995), alguns autores sugerem menor responsividade a citocina por parte do linfócito T (HOFFMAN-GOETZ et al., 1986; GONZALEZ-MARTINEZ et al., 2008).

A resposta inespecífica, mas altamente complexa do organismo a estímulos tais como infecções, trauma mecânico, térmico ou químico e crescimento tumoral é conhecida como um conjunto, como “resposta de fase aguda”. Esta decorre da síntese de vários fatores humorais, entre eles a proteína C reativa, α 1 antitripsina, componente C3 do complemento, inativador de C1 esterase, haptoglobina e o fibrinogênio. Por sua vez, a síntese destas proteínas é regulada por citocinas como IL-1, IL-6 e TNF.

Hoje está bem estabelecido que estes mecanismos reguladores estão na dependência, dentre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo. Estudo de Lyomi e colaboradores (1998), em modelo experimental de desnutrição, demonstraram que algumas destas proteínas são expressas de maneira diferente no desnutrido; assim a α 2 macroglobulina estava aumentada no desnutrido tendo seus valores normalizados com a realimentação, enquanto a α 1 glicoproteína ácida não era influenciada pelo estado nutricional (LYOMI et al., 1998).

A maioria dos trabalhos relacionando desnutrição e sistema imune foi realizado em crianças desnutridas de países subdesenvolvidos (WATTS, 1969; CHANDRA, 1991, REID et al., 2002). No entanto, estudos em idosos desnutridos de países desenvolvidos constataram alterações semelhantes e compatíveis com a diminuição do número absoluto de linfócitos T periféricos, especialmente da subpopulação CD4⁺ (LESOURD, 1995; MUSCARITOLI et al., 2001).

2.5 Exercício e sistema imunológico

Os aspectos até agora abordados mostram uma estreita relação entre o estado nutricional do indivíduo e sua capacidade imunológica, havendo comprometimento desta resposta em casos de desnutrição. Por outro lado, é crescente a prática de atividade física regular pela população, e esta tem se mostrado importante ferramenta no tratamento e prevenção de inúmeras doenças, assim como importante recurso na melhoria de qualidade de vida da população.

A relação entre exercício e sistema imune é tema de um número cada vez maior de trabalhos (NIEMAN et al., 1989a; NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; SHEPARD e SHEK, 1994; MACKINON, 1998) e seu estudo envolve a complexa interação entre o sistema imune e neuroendócrino (MAHAN e YOUNG, 1989; PEDERSEN et al., 1997; PEDERSEN e NIEMAN, 1998; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; SMITH, 2003; YEH et al., 2005).

As alterações da resposta imune após o exercício podem ser divididas em dois tipos. As observadas no exercício agudo são respostas rápidas, de curta duração, que desaparecem logo após o esforço. Um segundo tipo de resposta é decorrente da adaptação do sistema imune frente à prática regular do exercício, ou treinamento (NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994, PEDERSEN e TOFT, 2000).

2.5.1. Exercício agudo e sistema imunológico

O estresse agudo, como uma sessão de exercício tem sido aceito como um causador de mudanças no rearranjo do sistema imunológico. Está estabelecido que o estresse pode ser um

forte coadjuvante na ativação do sistema imune inato, principalmente em resposta a antígenos (NIEMAN e PEDERSEN, 1999; WOODS et al., 2006; EDWARDS et al., 2007).

Na chamada resposta aguda ao exercício, os estudos demonstram que há um aumento na apoptose tímica e uma queda na celularidade (HOFFMAN-GOETZ et al., 1989), estando os glicocorticóides comumente implicados. Também sugere-se que o estresse oxidativo tenha um papel importante no aumento da apoptose de timócitos (AZENABOR e HOFFMAN-GOETZ, 1999; QUADRILATERO e HOFFMAN-GOETZ, 2005).

Além da apoptose tímica, há leucocitose, com aumento de 50 a 100% de células, principalmente à custa de neutrófilos e linfócitos, e em menor grau de monócitos (GABRIEL et al., 1991, 1992). Na recuperação pós-exercício, em curto prazo, ocorre redução no número de linfócitos em até 50% em comparação com os níveis pré-exercício, sendo que o número de neutrófilos se mantém elevado (KENDALL et al., 1990). Estas alterações, de maneira aguda refletem basicamente mudanças nas concentrações de adrenalina e cortisol, que por sua vez são dependentes da duração do exercício. Encerrada a atividade física, há uma diminuição rápida nas concentrações de adrenalina, enquanto o cortisol permanece elevado por algumas horas (PEDERSEN, 2000).

O exercício induz ainda aumento na expressão de receptores β 2-adrenérgicos nos linfócitos (VAN TITS et al., 1990; KRUGER et al., 2008), havendo associação entre concentrações de adrenalina e mobilização de linfócitos. O aumento do cortisol está associado ao aumento no número absoluto de neutrófilos e decremento no de linfócitos. (CUPPS e FAUCI, 1982; MAISEL et al., 1990; KRUGER et al., 2008).

Deve-se ressaltar que, dentre as populações celulares envolvidas na resposta imune, as células NK têm sido apontadas como as que apresentam maiores alterações em situações de exercício (NIEMAN et al., 1993b). Linfócitos T $CD8^+$ também se têm mostrado em número aumentado após exercício de alta intensidade (NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994). Tal resposta pode ser explicada por um aumento transitório na concentração de receptores β 2 adrenérgicos em células NK e T $CD8^+$ (KHAN et al., 1986), retornando aos níveis pré-exercício com o repouso. Também foi sugerido que células expressando alta densidade da molécula de

adesão celular LFA-1, como células NK e monócitos, apresentam mobilização mais rápida (GABRIEL et al., 1992).

Além disso, há mudanças funcionais de linfócitos T, com diminuição da resposta proliferativa a mitógenos no período pós-exercício imediato (FRY et al., 1992). Entre as diversas explicações para este fenômeno, foi sugerida a influência direta do cortisol ou inibição da produção de IL-2 (CUPPS e FAUCI, 1982).

Foram relatados aumento da concentração plasmática de IL-6 (Sprenger et al., 1992) e IL-1 (SHEPARD e SHEK, 1994) e aumento da excreção urinária de IL-1 β , do receptor solúvel de IL-2, IL-6, IFN γ , e de TNF α (SPRENGER et al., 1992), sendo estes achados relacionados à intensidade do exercício. A produção *in vitro* de citocinas por células obtidas de atletas após esforço extenuante está de modo geral diminuída, com exceção de IFN- γ (NORTHOFF et al., 1994).

As alterações descritas acima são consequência do exercício realizado de maneira aguda. O exercício praticado de maneira regular leva às chamadas adaptações crônicas ao exercício (NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; PERDERSEN e TOFT, 2000).

2.5.2 Exercício crônico e sistema imunológico

Evidências epidemiológica revelam que o exercício regular é um protetor contra doenças crônicas degenerativas, como doenças cardiovasculares, neurológicas como demência e depressão, bem como está associado com as baixas taxas de incidência e mortalidade para vários tipos de câncer (WOODS et al., 1994; WOODS et al., 1999; WOODS et al., 2006).

Estudos comparativos entre atletas e não atletas enfatizam, principalmente, aumento significativo da atividade citotóxica de células NK (CRIST et al., 1989) em indivíduos que praticam exercícios de maneira regular, e tal fenômeno podem estar associado ao baixo teor de gordura corporal total (NIEMAN et al., 1993^a; PERDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000).

O efeito isolado da atividade física moderada sobre linfócitos T foi examinado em ratos machos adultos: comparado ao grupo sedentário, o grupo treinado por quatro semanas apresentou

maior porcentagem de timócitos maduros ($CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$, $CD4^-CD8^-$) e de linfócitos T $CD8^+$ no baço, e diminuição relativa de tais células nos linfonodos, indicando modificação na composição celular dos órgãos linfóides (FERY et al., 1992).

Outro dado interessante relacionado à função do linfócito T é descrito no idoso, no qual ocorre diminuição de cerca de 50% da capacidade proliferativa da célula T (PAWELEC et al., 1995). No entanto, indivíduos idosos com excelente condicionamento físico apresentaram relativa normalização da resposta proliferativa (NIEMAN et al., 1993a). O mesmo fato foi observado em modelo experimental, no qual a resposta proliferativa de linfócitos T esplênicos de ratos idosos submetidos a condicionamento físico se comparou a de ratos jovens sedentários (NIEMAN e CANNARELLA, 1994).

É ainda interessante notar que Kintzel e colaboradores (1998) demonstraram que camundongos submetidos a estímulo estressante apresentavam resposta inflamatória diminuída frente à injeção de bactérias mortas, ocorrendo supressão ainda maior pelo exercício físico. No entanto, a perda de peso corporal e a diminuição do timo, que ocorriam em animais sedentários submetidos ao estresse, eram revertidas nos animais envolvidos em programa de condicionamento físico. Estas mudanças observadas com o exercício não ocorriam de maneira inespecífica, pois o peso do baço não apresentava esta alteração.

Experimentos em modelos animais indicam que o exercício moderado pode aumentar a resistência a tumores experimentais (SHEPARD e SHEK, 1994), talvez por alteração na expressão de moléculas de adesão (HOFFMAN-GOETZ et al., 1994), sendo sugerido, em humanos, que o exercício moderado possa proteger contra alguns tipos de câncer (SHEPARD, 1993).

Por outro lado, atletas engajados em treinamento exaustivo, assim como animais submetidos a modelos de exercícios que levam à exaustão, mostraram supressão da função linfocitária (FRY et al., 1992; MACNEIL et al., 1991; MACKINNON, 1997).

Ainda assim, é noção consensual de que o exercício físico promove benefícios à saúde tem encontrado apoio científico (FRIES et al., 1996) ainda que possa e deva ser questionada em situações especiais (NIEMAN e NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994). Devemos destacar, no entanto, que a maioria dos estudos relacionando exercício e sistema

imune foi feito em países desenvolvidos, onde o esporte é essencialmente praticado por indivíduos bem nutridos.

Embora a literatura seja rica em estudos sobre a influência da desnutrição no sistema imune e exista um número crescente de publicações relacionando exercício e sistema imune, são poucos os estudos que apontam as repercussões recíprocas entre estado nutricional, exercício e resposta imunológica (PERALES et al., 1992).

2.6 Desnutrição, exercício e sistema imunológico

A interação entre nutrição e exercício tem sido estudada habitualmente do ponto de vista de obesidade e de suas repercussões metabólicas, cardiovasculares e, mais recentemente, imunológicas. Em modelo experimental com ratos Zucker obesos, o treinamento por exercício físico foi capaz de restaurar funções da imunidade celular, avaliada por meio da atividade NK e resposta mitogênica de linfócitos T induzida por concanavalina A (MORIGUCHI et al., 1998).

Apesar da existência de poucos estudos sobre o assunto, a relação entre exercício e desnutrição revela influência negativa da desnutrição na capacidade de trabalho aeróbico (BARAC-NIETO et al. 1978; DESAI et al., 1984). Foram também demonstradas alterações estruturais musculares precoces em indivíduos submetidos a dietas hipocalóricas (RUSSEL et al., 1984). Em estudos com pacientes portadores de anorexia nervosa, um modelo de desnutrição em países desenvolvidos, a realimentação mostrou melhora do desempenho muscular com normalização da massa muscular e do consumo de oxigênio somente em longo prazo (RIGAUD et al., 1997).

O timo é um órgão linfóide central, que com o avanço da idade segue para uma atrofia com uma progressiva perda da sua arquitetura e celularidade (VIRTS et al., 2008). Essa involução pode também estar associada à desnutrição e infecção (SAVINO, 2006, 2007). Estudos têm sugerido meios para reverter ou restaurar as suas funções perdida com envelhecimento (HIROKAWA, 1997; WOODS et al., 2003; VIRTS et al., 2006), porém os estudos sobre o exercício físico e a funcionalidade tímica ainda são controversos (MORASKA et al., 2000; PEIJE

et al., 2003; WOODS et al., 2003). No entanto, nosso grupo registrou uma recuperação na estrutura tímica de ratos desnutridos com o exercício físico (CUNHA et al., 2004).

Na anorexia as alterações imunológicas são mais pronunciadas nas fases iniciais, havendo uma adaptação que se reflete numa menor propensão à infecção com o passar do tempo, se comparando-se ao quadro observado em animais desnutridos (MARCOS, 2000; MARCOS et al., 2003). Esta adaptação parece estar relacionada com modificações no eixo neuroimunoendócrino, capazes de ativar mecanismos compensatórios (MARCOS et al., 2003). Como parte deste eixo, podemos destacar o cortisol e a leptina, candidatos potenciais a fatores adaptogênicos na resposta do organismo à anorexia (NOVA et al., 2002), e que tem seu metabolismo alterado em resposta ao treinamento físico (KIMURA et al., 2004).

Assim, entre os candidatos a elo entre as alterações imunes observadas na vigência da desnutrição e o exercício, podemos listar, além da leptina e do cortisol, a glutamina como candidata. De fato, a glutamina, aminoácido não essencial, mas importante no metabolismo de células musculares e de linfócitos (NEWSHOLME et al., 1988) mostrou-se, quando administrada *in vitro* a linfócitos obtidos de ratos desnutridos, capaz de reverter, parcialmente, as alterações funcionais observadas nestas células, tais como proliferação celular e produção de IL-2, por células esplênicas e do linfonodo mesentérico (CUNHA et al., 2003). Sabe-se que as concentrações plasmáticas de glutamina diminuem em resposta a uma sessão aguda de exercício físico prolongado e de intensidade moderada/alta (ROHDE et al., 1996; BACURAU et al., 2002; BASSIT et al., 2000; CASTEL, 2003), assim como na desnutrição (CURI et al., 1999), mas se encontram preservadas ou mesmo ligeiramente elevadas em resposta a um programa crônico de exercícios (CASTEL, 2003).

Um fato importante a ressaltar é que a leptina é um hormônio cuja expressão e secreção ocorrem primariamente no tecido adiposo branco e que age pela ativação de isoformas específicas de receptores em vários tecidos (HULVER e HOUMARD, 2003) e exibindo um ritmo circadiano, no qual as mais altas concentrações são próximas a meia noite e mais baixas próximo ao meio dia. (FRIEDEMANN et al., 1998), realizando um papel chave na homeostase energética (CHAN e MANTZOROS, 2005). Estudos têm avançados no entendimento da fisiologia da

leptina e estabelecido que o seu principal papel seja o sinal da disponibilidade energética em estados de privação (HULVER e HOUMARD, 2003; CHAN e MANTZOROS, 2005).

O envolvimento desse hormônio sobre o sistema imunológico também é alvo de pesquisa recente (HOWARD et al., 1999; SAVINO, 2002; MITO et al., 2004; SCHAIBLE e KAUFFMANN, 2007). A hipótese de que em estado de desnutrição há um desequilíbrio na produção de leptina.

Com relação aos efeitos do treinamento físico moderado sobre a resposta imune de ratos desnutridos, observamos maior capacidade proliferativa de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico e do baço, assim como maior produção de γ -interferon, IL-1, TNF e IL-2, associados à recuperação das concentrações plasmáticas de glutamina e à expressão gênica da glutamina sintetase no músculo esquelético destes animais (CUNHA et al., 2004).

As considerações ora colocadas nos levam, portanto, a indagar qual será o efeito do exercício crônico sobre as alterações promovidas pelo quadro de desnutrição.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, obtidos no biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento (Certificado 009/2005 da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

Todos os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais, a uma temperatura média de 24 °C, com ciclos de claro/ escuro a cada 12 horas de modo controlado (início do período de claro às 19h00min).

3.2 Protocolo de desnutrição

A partir do desmame, no 21^o dia, os animais pesando inicialmente entre 50 e 60g foram separados em dois grupos. Um grupo foi oferecido ração com conteúdo normal de proteína (18%) NUVILAB^R CR1(Nutrivital Nutrients LTDA), em quantidade fixa, equivalente à média consumida por um rato de mesma idade, mantido nas mesmas condições e biotério. Ao segundo grupo de animais desnutridos é oferecida metade da ração consumida pelos animais do grupo controle, para se estabelecer um quadro de restrição calórica, sendo o fornecimento sendo feito diariamente em diferentes horários para não caracterizar uma adaptação (*Pair-feeding*) aos horários de alimentação. O controle de peso foi avaliado semanalmente, através de uma balança de precisão Triple Beam Balance (OHAUS^R) (CUNHA et al., 2003).

3.3 Subdivisão dos grupos experimentais

A partir do 52^o dia de vida, os grupos acima mencionados foram subdivididos em grupos de animais sedentários e animais submetidos a exercício, gerando quatro subgrupos de experimentação (Figura 1).

Subgrupo de ratos eutróficos sedentários (ES)

Esse grupo foi o controle, os animais receberam água e comida *ad libitum*, sem participar do protocolo de treinamento.

Subgrupo de ratos eutróficos em exercício (ET)

Esses receberam água e comida *ad libitum*, sendo submetidos ao protocolo de treinamento.

Subgrupo de animais desnutridos sedentários (DS)

O grupo teve ração controlada, sendo oferecida metade da média semanal ingerida pelos animais eutróficos.

Subgrupo de animais desnutridos submetidos a exercício (DT)

Esse é o grupo de ratos de ração controlada, sendo submetidos ao protocolo de treinamento.

Figura 1 – Organograma do delineamento do estudo.

3.4 Determinação do consumo de oxigênio (VO_{2max})

Uma semana antes do início do treinamento e a cada 2 semanas de treinamento (sexta e sábado) durante o período de treinamento os animais foram avaliados conforme método descrito anteriormente (BEDFORD et al., 1979). As amostras de ar foram avaliadas em um sistema de calorimetria de circuito aberto *Columbus Instruments*, através da fração de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) na entrada e saída em uma câmara com fluxo de ar constante de 1 ml/min. Após um período de estabilização do aparelho, os ratos foram submetidos a 5 minutos de aquecimento a uma velocidade de 7 metros/minuto e a cada 3 minutos houve um incremento de 5 metros por minuto até a exaustão (Tabela 1).

3.5 Teste de exaustão (T.E)

A velocidade obtida no teste de VO_{2max} foi utilizada para a realização do teste exaustão, que consistia em submeter os ratos a uma corrida a 80 % da sua velocidade máxima até a total exaustão, quando os ratos não conseguiram desempenhar mais efetivamente a corrida ou cessar sua corrida imediatamente (Tabela 2).

3.6 Protocolo de treinamento

Os ratos, animais de hábitos noturnos, foram treinados no período escuro com luz vermelha, estabelecendo um ciclo invertido, com o horário de treinamento fixado entre as 15h e 18h.

Os animais dos grupos em exercício foram submetidos a um período de treinamento em esteira ergométrica (AVS projetos especiais) para ratos, desenvolvido por Cunha et al. (2004). Inicialmente houve uma adaptação a esteira por duas semanas ao protocolo de

treinamento, iniciando-se o exercício diário com 30 minutos, subsequentemente aumentando-se o tempo por dia em 10 minutos até 60 minutos, a uma velocidade inicial de 5 metros por minuto, que foi aumentada até que se alcançasse a intensidade relativa entre 60 a 65% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}).

Os dois grupos foram treinados por 5 dias na semana por 1 hora, como o esquema abaixo:

Tabela 1. Protocolo de treinamento em esteira ergométrica.

	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.		
	Feira	Feira	Feira	Feira	Feira		
	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Tempo	Vel.	Teste
	(min)	(min)	(min)	(min)	(min)	(m/min)	
1a. semana	30	35	40	45	50	5	Exaustão/ VO_{2max}
2a. semana	30	35	40	50	60	10	
3a. Semana	30	35	40	50	60	13	
4a. semana	30	35	40	50	60	15	
5a. semana	30	35	40	50	60	18	
6a. semana	30	35	40	50	60	20	
7a. semana	30	35	40	50	60	21	
8a. semana	30	35	40	50	60	22	
9a. semana	50	50	60	60	60	23	
10a. semana	50	50	60	60	60	23	Exaustão/ VO_{2max}

Ao final do período de treinamento, foram avaliados os efeitos do protocolo de treinamento através do método aferição do VO_{2max} e do teste de exaustão.

Tabela 2. Protocolo de teste de desempenho e de VO_{2max} .

Tabela 2. Protocolo de teste de desempenho e de VO_{2max} .

Tempo do Estágio (min.)	Velocidade (m/min.)
3	10
3	15
5	20
5	25
5	30
5	35
5	40
5	45
Sucessivamente até a exaustão	

Após o desempenho no teste de VO_{2max} , os ratos foram posto a correr a 80% da velocidade máxima obtida no teste de VO_2 , até que não conseguissem mais manter a velocidade ou até pararem na esteira.

Em seguida, 24h após a última sessão de treinamento os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, sempre pela manhã, para minimizar os efeitos de possíveis variações circadianas. Foram coletados o timo, o baço e linfonodos, músculo sóleo e gastrocnêmios, que foram processados. Também foi colhido sangue periférico com e sem anticoagulante, centrifugado a $676 \times g$ (2500 RPM) em uma centrífuga Juon, modelo MR22i a uma temperatura de 10°C , para obtenção de plasma e soro para a dosagem metabólica e hormônios.

3.7 Análise pelo DEXA (DUAL-Energy X - Ray Absormetry)

Na última semana de treinamento foi analisada a composição corporal dos animais através do DEXA (DUAL-Energy X - Ray Absormetry) executado num escâner QDR1000(Hologic, Whaltman, MA).

Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de 0,15- 0,2 ml ketamina (75 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), e colocados em pronação sobre o escâner para a aquisição das imagens.

A calibração do instrumento foi realizada como recomendada pelo fabricante, a partir de qual o controle de qualidade com BDM (0.0553 g/cm^2) e a percentagem de gordura eram também adquiridas cada vez que o instrumento era ligado.

O coeficiente de variação do BMD foi calibrado para ser menos do que 1 % e o desvio padrão da gordura $\pm 1 \%$ para o controle de qualidade. Toda a análise foi determinada usando o PIXImus densiometer (versa do software 2.00).

A precisão do estudo foi conduzida de acordo com as recomendações de Gluer et al. (1995).

3.8 Conteúdo de lípidos na carcaça

As carcaças cozidas em um Becker de pirex com volume de um litro com água destilada na proporção de 1:1(P:V) em autoclave Phoenix (Phoenix Equipamentos) a uma temperatura de 120 °C, sob uma pressão de 1/kgf./cm² por uma hora. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em um processador Blender (Waring Laboratory model 38bl52).

Para determinação do conteúdo de lípidos da carcaça foi utilizado o método adaptado de Stansbie et al. (1976), em que 3g de amostra do homogeneizado da carcaça do animal e 1 g de tecido (fígado) foram saponificados em KOH 30% a 70 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 ml de etanol absoluto às amostras que foram mantidas aquecidas a 70 °C por 2 horas. Após o resfriamento, foram adicionados 2,5ml de ácido sulfúrico, e então os lipídios foram extraídos através de agitação por 10 minutos com 8, 6 e 4 ml de éter de petróleo, respectivamente.

A fração de éter de petróleo contendo os lipídios foi lavada com 2 ml de água destilada, sendo seu conteúdo final transferido para pequenos frascos de vidro, previamente pesados. A massa de gordura presente na amostra de tecido, contendo principalmente ácidos graxos e colesterol, foi determinada gravimetricamente, após a evaporação do éter de petróleo.

3.9 Determinação da concentração de proteínas nas amostras

Utilizou-se a metodologia descrita por Lowry et al. (1951) para a determinação do conteúdo de proteína. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares com posterior reação com o reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu, em solução contendo Na₂CO₃ 200 mM, NaOH 100 mM, tartarato de sódio e potássio 1 mM e sulfato de cobre 20 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 750 nm e os valores obtidos foram comparados com curva padrão de albumina.

3.10 Parâmetros imunológicos

3.10.1 Organização histológica do timo e a rede epitelial tímica

Após o sacrifício, o timo foi coletado e pesado, depois fixado em solução de paraformaldeído 4% por 18h. Após este período, ele foi transferido para uma solução de álcool a 70% por 24h, posteriormente submetidas a banhos de álcool 96% e 100%, xilol e paraplast e mantido em estufa a 60 °C por 1h.

O material foi incluído em polilisina e levado para a estufa a 60 °C por 5h, para a coloração, passando por banhos com xilol, álcool 100%, 96% e 70%, água destilada ácido perclórico, reativo de Schiff e sulfeto de sódio. Após estes procedimentos, o material foi montado em resina. A análise foi conduzida em microscópio Nikon Eclipse E600, sendo que as fotografias foram obtidas com câmera digital (cool Snap – PROcf color) e processadas pelo Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

3.10.2 Celularidade de subpopulações de timócitos

O número de células em cada estágio de diferenciação timocitária, definida pelos marcadores CD3 e CD4 foi feito através de contagem de número total de timócitos e posterior análise citofluorimétrica em duas cores descrito por Dalmau et al. (1999).

Após a decapitação o timo foi retirado e colocado em meio RPMI 1624, após retirado da cápsula gordurosa, posteriormente o órgão foi macerado manualmente em um vidro pirex com embolo em presença de PBS com 5% de SFB, e então centrifugado 2 vezes em 1500 rpm.

A viabilidade das células foi avaliada com Trypan Blue num Hemocitometro (Improved Neubauer, Max Levy, USA) e colocadas numa placa de 96 wells (1×10^6 células), adicionando-se 2 μ l de soro do rato por 15 min., a uma temperatura de 4 °C. Posteriormente as células foram

incubadas com anticorpos conjugados com fluorocromos, CD3 PE Pharmigen nº 554830, CD4 FITC Pharmigen nº 554835, CD8 PE Pharmigen nº 554857, todos diluídos 1:100, por 30 minutos a 4 °C sob proteção de papel alumínio. Terminado o tempo de incubação, 100 µl de PBS foram adicionados a cada well e as placas foram centrifugadas a 1500 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e colocou-se 150 µl de formaldeído 1% para fixação das células. As células foram retiradas das placas e colocadas no tubo de facs, acrescentando mais 150 µl de formaldeído. A aquisição foi realizada por um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Immunocytometry Systems), com o programa Cell Quest para aquisição das amostras e analisadas pelo programa WinMDI 2.8, que analisou o número de eventos das amostras.

3.10.3 Resposta proliferativa dos Linfonodos e Baço

Após o sacrifício, os linfonodos e o baço foram removidos e colocados em tubos falcon (Corning, NY, USA) com tampão fosfato salina (PBS) a 0,9% (w/v), com PH 7.4. Então as amostras foram homogeneizadas com um êmbolo de seringa em uma peneira de metal sobre uma placa de petri, e então passadas através de um filtro Whatman (Whatman cat: 2105 841) (CURI e NEWSHOLME, 1989).

As células em suspensão foram centrifugadas em 500 g por 15 minutos a temperatura ambiente e então a viabilidade celular foi determinada pela coloração com Trypan Blue. A contagem foi realizada em um Hemocitometro (Improved Neubauer, Max Levy, USA).

Os linfócitos foram colocados em cultura numa placa de 96 Wells (Corning, NY, USA), numa densidade de 2×10^5 de células/ml por compartimento da placa em meio RPMI-1640 (GibcoBRL) com glutamina, soro fetal bovino a 10% (SFB), estreptomicina-penicilina (GibcoBRL) e diferentes mitógenos: 5 µ/ml ConcanavalinaA (ConA), 5 µl Lipopolissacarídeo (LPS) e com 40 u/ml de IL2, perfazendo um total de 200 µl para cada compartimento. As placas foram transferidas para uma Incubadora com Microprocessador de CO₂ LAB LINE, USA por 48h. Após essa incubação, as células foram pulsadas com 20 µl (0.02 µCi) [2-¹⁴C]-Timidina diluída em PBS, e mantidas sob as mesmas condições por mais 16 h, depois foram coletadas

automaticamente por um coletor múltiplo de células (multiple cells harvester Skatron Instruments, Norway) com filtro de papel (cat: 11731 Skatron Combi, Suffolk, UK).

Os discos contidos no papel com as células incorporadas com a timidina, foram colocadas dentro de um frasco com 5 ml de Ecolume^R (ICN, CA, USA scintillation cocktail) e a radioatividade medida em um analisador de líquido de cintilação Beckman-LS 5000TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

3.10.4 Expressão gênica do RNAm da Enzima Glutamina Sintetase

Após o sacrifício, o músculo sóleo pesando aproximadamente 50 mg foi retirado e colocado em tubo contendo 500 µl de Trizol^R Reagent e homogeneizado em um homogenizador Polytron PT 3100. Após a homogeneização, o tecido foi incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. Adicionou-se 200µL clorofórmio às amostras então centrifugadas a 10.500 RPM a 4 °C por 15 minutos para a separação de uma fase aquosa, que foi transferida para novos tubos (eppendorf). Em seguida colocou-se 500 µl de álcool isopropílico foi, agitando-se por 15 segundos, incubando-se por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugando-se em 10.500 RPM a 4 °C para precipitação do RNA, formando um pellet no fundo do tubo, sendo este lavado com etanol 95% e centrifugado a 7.500 RPM a 4 °C, secando em temperatura ambiente (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

As amostras foram solubilizadas em água-DEPC, para avaliação da concentração e pureza do RNA_{tot}, que foi realizada por ensaio espectrofotométrico (espectrofotômetro SHIMADZU UV mini 1240) sob o comprimento de onda de 260 e 280 nm. A razão $A_{260/280}$ é proporcional a concentração de RNA_{tot} na amostra.

O cDNA foi gerado por um Termociclador(Techno Cambrige), pela incubação de 2 µg de RNA da amostra na presença de 0,5 µg/µl oligo dT 12-18 (Invitrogen, USA), 10 mM dNTPs, 0,1M de DTT, RT buffer 5x, 2µl de M-MLV Reverse Transcriptase e (20U), completando com água-DEPC para 20µl, por 10 minutos à 21 °C, por 30 minutos à 42 °C e 10 minutos à 99 °C no termociclador. O cDNA foi fracionado em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio.

Após a visualização da integridade do cDNA este foi amplificado utilizando-se 3 µl do produto e 0,5 µl da enzima Taq DNA polimerase (2,5U), MgCl₂ (1,25 mM), dNTPs Mix (0,2 mM) e oligossondas específicas da Glutamina sintetase obtida através GeneBank com a sequência sense TGA CAA GAT GGG CAA CAG TG e antisense GTT ATT CCA CCT GTC CTT GG na presença do controle interno RPL19, com sequência sense AGG CTA CAG AAG AGG CTT GC e antisense CAA TGA GAA TCC GCT TGT TT, sendo o cDNA amplificado em 28 ciclos. Cada ciclo consistiu em 95 °C na temperatura desnaturante por 1 minuto, 60 °C para anelamento por 35 segundos e 72 °C para a extensão. Terminado os ciclos 5 µl da amostra foram adicionadas no gel de agarose e as imagens captadas pelo analisador Typhoon (Molecular Dynamics) e quantificada (ImageQuaNTTM software)

3.11 Parâmetros metabólicos

3.11.1 Radioimunoensaio (RIE) para ACTH

Para a determinação quantitativa do hormônio plasmático ACTH (DSL-2300) foi utilizado um kit radioimunoensaio (RIE) de competição entre um antígeno radioativo e outro não radioativo por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo (Gênese, Diagnostic System Incorporation, Inc, USA).

Este ensaio foi realizado com alíquotas de plasma proveniente dos diferentes grupos experimentais. As amostras foram descongeladas em banho de gelo e mantidas a 4 °C ou menos. Foram incubados 200 µL de plasma, padrões e mais 300 µL do padrão A (0 ng/mL) para o NSB (ligação não específica). Por último, foram adicionados 100 µL de anti-soro ACTH de rato, agitado suavemente durante 1 minuto, por 4 horas a 37 °C (exceto o tubo NSB). Após este período, foram adicionados 100 mL de reagente Precipitante em todos os tubos (exceto o tubo NSB) e incubados *overnight* a 4 °C. Findado este prazo, foi adicionado 1 mL de reagente

Precipitante, agitado imediatamente e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Todos os tubos foram centrifugados (exceto o tubo NSB) por 15 minutos a 1500 x g.

Os tubos foram decantados por inversão simultânea com o suporte de espuma, em recipiente para descarte de radioativo, com auxílio de papel absorvente, durante 2 minutos e contados em contador gama por 1 minuto. Os resultados foram calculados utilizando os dados de log (eixo-x) vs. log (eixo-y) e a % B/T foi utilizado para determinar as concentrações dos pontos da curva. A sensibilidade de detecção do método foi de 3,5 pg/ml (Padrão 0 pg/ml).

3.11.2 Radioimunoensaio (RIE) para Leptina

Para a determinação quantitativa do hormônio sérico Leptina (RL-83K) foi utilizado o kit radioimunoensaio (RIE) de competição entre um antígeno radioativo e outro não radioativo por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo (Genese, Diagnostic System Incorporation, Inc, USA), específico para a espécie estudada.

Este ensaio foi realizado com alíquotas de soro proveniente dos diferentes grupos experimentais. Antes do doseamento, as amostras foram descongeladas em banho de gelo e mantidas a 4 °C ou menos. Foram incubados 200 µL de soro, padrões e mais 300 µL do padrão A (0 ng/ml) para o NSB (ligação não específica). Por último, foram adicionados 100 µL de anti-soro Leptina de rato, agitado suavemente durante 1 minuto, por 4 horas a 37 °C (exceto o tubo NSB). Após este período, foram adicionado 100 µL de reagente precipitante em todos os tubos (exceto o tubo NSB) e incubados *overnight* a 4 °C. Findo este prazo, foi adicionado 1 mL de reagente Precipitante, agitado imediatamente e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Todos os tubos foram centrifugados (exceto o tubo NSB) por 15 minutos a 1500 x g.

Os tubos foram decantados por inversão simultânea com o suporte de espuma, em recipiente para descarte de radioativo, com auxílio de papel absorvente, durante 2 minutos e contados em contador gama por 1 minuto. Os resultados foram calculados utilizando os dados de log (eixo-x) vs. log (eixo-y) e a % B/T foi utilizado para determinar as concentrações dos pontos da curva. A sensibilidade de detecção do método foi de 0,05 ng/mL (Padrão 0,01 ng/mL).

3.11.3 Determinação das concentrações da glutamina plasmática

As concentrações de glutamina no plasma foram determinadas enzimaticamente segundo o método descrito por Windmueller; Spaeth (1974) adaptado a partir de Cooney e colaboradores (1971) e Kirsten e colaboradores (1963), cujo princípio é a conversão de nicotidamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) em nicotidamida adenina dinucleotídeo pela ação da enzima glutamato desidrogenase, cuja função é formar glutamato a partir de α -cetoglutarato e amônia que foi formada no meio, a partir da reação da glutamina já existente com a asparaginase. O meio de ensaio (pH 8,0) foi constituído por fosfato de potássio dibásico (KH_2PO_4) 50 mM, glicerol 50%, NADH 4 mM, albumina defatada (BSA) 10%, GDH 5,0 U/ml, α -cetoglutarato 4,0 M e asparaginase 5,0 U/ml. Após a incubação em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm para a determinação da quantidade de NADH consumido no meio, que é proporcional a quantidade de glutamina da amostra. Os valores estão expressos em nmol/ml.

3.11.4 Determinação das concentrações glutamato plasmático

As concentrações de glutamato no plasma foram determinadas segundo o método descrito por Bernt; Bergmeyer (1974) cujo princípio é a redução do NAD a NADH após a reação do glutamato do meio com GDH. Neste método, o meio de ensaio (pH 9,0) foi formado por glicina 300mM, hidrato de hidrazina 250mM, adenina-5'-difosfato (ADP) 1,0 mM, NAD 1,6 mM e GDH 4,5 u/ml. Após 60 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi medida a

absorbância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 340nm para a determinação da quantidade de NADH formado, que corresponde à quantidade de glutamato na amostra. Os valores estão expressos em nmol/ml.

3.11.5 Dosagem das concentrações de glicose plasmática

Foi determinada através de kit enzimático comercial Glicose HK Labtest® Diagnóstica que consiste no seguinte princípio: a ATP promove a fosforilação da glicose em uma reação catalisada pela hexoquinase (HK). A glicose-6-fosfato produzida na reação é oxidada a 6-fosfogluconato na presença de NAD, em reação catalisada especificamente pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Ocorre a produção de um mol de NADH para cada mol de glicose-6-fosfato que é oxidado. A absorbância resultante, medida em 340nm, é diretamente proporcional à concentração da glicose na amostra. Os valores expressos mg/dl.

3.11.6 Dosagem das concentrações insulina plasmática

Foi determinada através do kit comercial da COAT-A-COUNT® Insulin por radioimunoensaio que consiste no princípio da competição entre a insulina porcina marcada com radioisótopo ^{125}I e a insulina fria (não marcada) pelo anticorpo anti-insulina produzida no animal. Mantendo-se constante a quantidade de hormônio radioativo e do anticorpo, a formação do complexo insulina marcada-anticorpo depende da quantidade de insulina fria presente na solução padrão. A concentração do hormônio na amostra foi determinada pela quantificação de radiação gama (em contagem por minuto). Os valores expressos em $\mu\text{UI/ml}$.

3.11.7 Índice glicose/insulina

Para determinação indireta da resistência a insulina foi calculada o índice glicose /insulina como descrito por Caro (1991), sendo seus valores expressos em

$$\text{INDICE} = [\text{GLICOSE}] \text{ (mg/dl)} / [\text{INSULINA}] \text{ (}\mu\text{UI/ml)}.$$

3.12 Análise dos resultados

Para cada variável quantitativa foram verificadas a normalidade e homoscedacidade dos dados. Os dados obedeceram aos critérios de normalidade e homoscedacidade, procedidos a testes de ANOVA (análise de variância) de duas vias para dados paramétricos e não paramétricos com pós-teste de Bonferroni. Em qualquer um destes casos os dois critérios de classificação efetuados na ANOVA, o estado alimentar dos animais e sua condição quanto a exercícios.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da desnutrição

4.1.1 Progressão do peso corporal

Os animais desnutridos sedentários (DS) ($174,34 \pm 2,55$ g) apresentaram um peso corporal 51% menor no final do período experimental em relação ao grupo eutrófico sedentário (ES) ($362 \pm 8,55$ g) ($P < 0,001$). O grupo desnutrido treinado (DT) ($154,94 \pm 5,77$ g) apresentou um peso corporal 52% menor no final do período experimental em relação ao grupo eutrófico treinado (ET) ($326,26 \pm 12,43$ g) ($P < 0,001$) e essa diferença foi observada também no tamanho dos animais (Figuras 2 e 4). Os animais do grupo D e DT apresentaram um ganho de peso corporal no decorrer do período experimental, menor taxa de que o grupo ES e ET. O grupo ET apresentou um peso corporal 9,9% menor que o grupo ES no final do período experimental ($P < 0,002$) (Figura 3). Após o início do treinamento os animais do grupo ET apresentaram uma redução no ganho de peso corporal em relação ao grupo ES.

Figura 2. Progressão de peso corporal durante o período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14), Desnutrido sedentário (DS) (n=11), Eutrófico treinado (ET) (n=8) e Desnutrido treinado (DT) (n=8). * $P < 0,05$ em relação ao grupo ES; # $P < 0,05$ em relação ao grupo ET.

Figura 3. Ganho de massa corporal durante o período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14), Desnutrido sedentário (DS) (n=11), Eutrófico treinado (ET) (n=8) e Desnutrido treinado (DT) (n=8). * $P < 0,05$ em relação ao grupo ES, # $P < 0,05$ em relação ao grupo ET.

Figura 4. Diferença de tamanho dos animais: à esquerda um rato desnutrido, à direita, o rato eutrófico.

4.1.2 Progressão da ingestão alimentar

Houve uma diminuição de 9,9% na ingestão de ração no grupo ET ($123,30 \pm 4,32$ g) em relação ao grupo ES ($135,70 \pm 4,02$ g) no final do período experimental ($P < 0,05$). Quando a ingestão alimentar foi expressa pelo peso corporal (g/semana/100 g de peso corporal) o grupo ET ($38,02 \pm 1,67$ g/semana/100g de peso corporal) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo ES ($41,64 \pm 2,46$ g/semana/100 de peso corporal) significativa em relação ao grupo ES ($41,64 \pm 2,46$ g/ semana / de peso corporal (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Progressão da ingestão alimentar durante o período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14) e Eutrófico treinado (ET) (n=8). * $P < 0,05$ em relação ao grupo ES.

Figura 6. Progressão da ingestão alimentar durante o período experimental. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14) e Eutrófico treinado (ET) (n=8). * P<0,05 em relação ao grupo ES.

4.1.3 Peso dos tecidos e composição corporal

No presente trabalho avaliamos o peso da glândula adrenal, o peso do timo, peso dos músculos sóleo e EDL e o peso de dois depósitos de lipídes – tecido adiposo retroperitoneal (TARP) e tecido adiposo epididimal (TAE). Como esperado, o peso absoluto de todos os tecidos avaliados apresentou uma grande redução em resposta à desnutrição e ao treinamento físico moderado associado à desnutrição (FIGURAS 7 a 12).

Com relação ao peso relativo, expresso como percentual do peso corporal, o TARP e o TAE apresentaram uma redução no grupo DS em relação ao grupo ES, e uma redução no grupo DT em relação ao grupo ET. O TAE dos animais do grupo ET ($1,00 \pm 0,08\%$) apresentou uma redução de aproximadamente 30% em relação ao grupo ES ($1,43 \pm 0,11\%$) ($P < 0,001$). O grupo ET ($3,61 \pm 0,46\%$) apresentou uma diminuição de aproximadamente 20% no peso relativo do TARP em relação ao grupo ES ($4,51 \pm 0,79\%$), sem apresentar diferença significativa ($P = 0,05$) (Figura 12).

Acerca do músculo sóleo, o grupo DT ($0,0422 \pm 0,0016\%$) apresentou um aumento em relação aos grupos DS ($0,0350 \pm 0,0020\%$) e ET ($0,0351 \pm 0,0017\%$). O peso relativo do músculo EDL foi menor nos grupos DS ($0,0454 \pm 0,0010\%$) e DT ($0,0462 \pm 0,0018\%$) em relação ao grupo ES ($0,0413 \pm 0,0014\%$) (Figuras 7 e 8).

O peso relativo da adrenal dos animais DS ($0,0236 \pm 0,0015\%$) mostrou aumento de 45% em relação ao grupo ES ($0,0162 \pm 0,0008\%$) ($P = 0,003$), o grupo DT ($0,0252 \pm 0,0014\%$) apresentou um aumento de 34% em relação ao grupo ET ($0,0188 \pm 0,0010\%$) ($P = 0,003$) (Figura 8).

Figura 7. Peso absoluto (g) dos músculos sóleos, extensor digitário longo (EDL), e da adrenal dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=12), eutrófico treinado (ET – n=8), desnutrido sedentário (DS – n=12), desnutrido treinado (DT – n=8). Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES; * p<0,05 em relação ao ET; # p<0,05 em relação ao DS.

Figura 8. Peso relativo (% - porcentagem do peso corporal) dos músculos sóleos, extensor digitário longo (EDL), e da adrenal dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=12), eutrófico treinado (ET – n=8), desnutrido sedentário (DS – n=12), desnutrido treinado (DT – n=8). Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES; #p<0,05 em relação ao ET; @ p<0,05 em relação ao DS.

Figura 9. Peso absoluto do timo dos grupos Eutrófico sedentário (ES) (n=12), Desnutrido sedentário (DS) (n=12), Eutrófico Treinado (ET) (n=8), Desnutrido treinado (DT) (n=8). Resultados apresentados em média e erro padrão * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES, # $p < 0,05$ em relação ao ET.

Figura 10. Peso relativo (%- porcentagem do peso corporal) do timo dos grupos Eutrófico sedentário (ES) (n=12), Desnutrido sedentário (DS) (n=12), Eutrófico Treinado (ET) (n=8), Desnutrido treinado (DT) (n=8).

Figura 11. Peso absoluto (g) dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (TARP), epididimal (TAE) dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=12), eutrófico treinado (ET – n=8), desnutrido sedentário (DS – n=12), desnutrido treinado (DT – n=8). Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES; #p<0,05 em relação ao ET; @ p<0,05 em relação ao DS.

Figura 12. Peso relativo (% - porcentagem do peso corporal total) dos depósitos de tecido adiposo retroperitoneal (TARP), epididimal (TAE) dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=12), eutrófico treinado (ET – n=8), desnutrido sedentário (DS – n=12), desnutrido treinado (DT – n=8). Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES; #p<0,05 em relação ao ET; @ p<0,05 em relação ao DS.

O grupo DS apresentou uma diminuição ($4,71 \pm 0,71 \%$) de 49% no percentual de gordura em relação ao grupo ES ($9,23 \pm 0,87 \%$) ($P < 0,002$). O grupo DT ($2,96 \pm 0,20\%$) apresentou uma redução de 66% em relação ao grupo ET ($8,87 \pm 1,27\%$) ($P < 0,001$). A massa magra do grupo DS ($95,28 \pm 0,71\%$) mostrou-se maior em 5% em relação ao ES ($90,76 \pm 1,30\%$) ($P < 0,002$) enquanto a massa magra do grupo DT ($97,03 \pm 0,20 \%$) foi 6,5% superior quando comparada à do grupo ET ($91,12 \pm 0,87\%$) ($P < 0,001$) (Figuras 13,14 e 15). No presente estudo o modelo utilizado divide a composição corporal dos animais em dois compartimentos, uma fração é o conteúdo de gordura e a outra fração é a massa magra, que compreende a massa isenta de gordura, calculada através da subtração do conteúdo de gordura da carcaça menos o peso da carcaça.

Figura 13. Composição corporal da carcaça (%), dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14), Eutrófico treinado (ET) (n=8), desnutrido sedentário (DS) (n=11) e desnutrido treinado (DT) (n=8). *P<0,05 em relação ao ES e #P<0,05 em relação ao ET.

Figura 14. Análise da massa magra através do DEXA, dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14), Eutrófico treinado (ET) (n=8), desnutrido sedentário (DS) (n=11) e desnutrido treinado (DT) (n=8). *P<0,05 em relação ao ES e #P<0,05 em relação ao ET.

Figura 15. Análise da massa gorda através do DEXA, dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES) (n=14), Eutrófico treinado (ET) (n=8), desnutrido sedentário (DS) (n=11) e desnutrido treinado (DT) (n=8). *P<0,05 em relação ao ES e #P<0,05 em relação ao ET.

4.1.4 Teste de desempenho

O grupo desnutrido treinado (DT) apresentou um significativo melhor desempenho de corrida, tanto com um maior tempo até a exaustão quanto com uma maior velocidade atingida no momento da fadiga, relativamente aos grupos eutróficos sedentário (ES) e treinado (ET) e desnutrido sedentário (DS).

4.1.4.1 Tempo até a exaustão

O tempo até a exaustão está demonstrado na figura 14. O grupo desnutrido treinado (DT) demorou $36,82 \pm 2,03$ minutos até entrar em exaustão, enquanto os grupos eutrófico sedentário (ES), $11,13 \pm 1,53\text{min.}$, eutrófico treinado (ET), $23,43 \pm 3,15\text{min.}$, e desnutrido sedentário (DS), $10,27 \pm 1,18\text{min.}$, demoraram significativamente menos tempo para chegar à exaustão.

Figura16. Tempo até a exaustão, em minutos (min.), dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=16), eutrófico treinado (ET – n=16), desnutrido sedentário (DS – n=16), desnutrido treinado (DT – n=16). Resultados representados em média e erro padrão. * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET. @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

4.1.4.2 Velocidade atingida na exaustão

A velocidade no momento da exaustão está demonstrada na figura 15, que ilustra qual velocidade cada grupo atingiu até o exato momento que entrou em fadiga. O grupo desnutrido treinado (DT) atingiu a velocidade de $48,75 \pm 2,39$ m/min. até entrar em exaustão, enquanto os grupos eutrófico sedentário (ES), $22,50 \pm 1,44$ m/min., eutrófico treinado (ET), $38,33 \pm 3,54$ m/min. e desnutrido sedentário (DS), $22,50 \pm 1,44$ m/min., atingiam uma velocidade significativamente menor no momento em que entraram em fadiga.

Figura 17. Velocidade de exaustão (m/min.) dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=16), eutrófico treinado (ET – n=16), desnutrido sedentário (DS – n=16), desnutrido treinado (DT – n=16) Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES. #p<0,05 em relação ao ET. @ p<0,05 em relação ao DS.

4.1.4.3 Consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$)

O consumo máximo de oxigênio ($VO_{2\text{máx}}$) realizado antes do período de treinamento está ilustrado na figura 16. Os resultados demonstraram não haver diferença significativa entre os grupos ES $27,05 \pm 2,53$ ml/kg/min., ET $21,38 \pm 1,57$ ml/kg/min., DS $26,45 \pm 1,43$ ml/kg/min. e DT $26,85 \pm 3,03$ ml/kg/min.

Figura 18. $VO_{2\text{máx}}$ (ml/kg/min.) realizado antes do período de treinamento dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=16), eutrófico treinado (ET – n=16), desnutrido sedentário (DS – n=16), desnutrido treinado (DT – n=16) Resultados representados em média e erro padrão. $p < 0,05$.

Já o $VO_{2\text{máx}}$ após o período de 10 semanas de treinamento apresentou resultado diferente e está ilustrado na figura 17. Os resultados demonstraram que o grupo DT apresentou um $VO_{2\text{máx}}$ significativamente maior, $41,90 \pm 1,72$ ml/kg/min., do que o grupo ES, $34,59 \pm 1,89$ ml/kg/min., ET $32,45 \pm 2,27$ ml/kg/min. e DS $34,31 \pm 1,86$ ml/kg/min.

Figura19. $VO_{2\text{máx}}$ (ml/kg/min.) realizado após o período de 10 semanas de treinamento dos grupos eutrófico sedentário (ES – n=16), eutrófico treinado (ET – n=16), desnutrido sedentário (DS – n=16), desnutrido treinado (DT – n=16). Resultados representados em média e erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo ES. #p<0,05 em relação ao ET. @ p<0,05 em relação ao DS.

4.2 Parâmetros Imunológicos

4.2.1 Caracterização do timo

A análise da marcação para CD3 mostrou que o grupo DS apresentou uma queda de aproximadamente 26%, $4628,33 \pm 304,39$ n° eventos, em relação ao grupo ES, $6327,33 \pm 95,77$. Ao passo que, o grupo DT demonstrou um aumento de aproximadamente de 60%, $7324,67 \pm 121,91$ em relação ao grupo DS, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo ET, $7860,4 \pm 103,32$.

Figura 20. Citometria de CD3 do Timo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES., @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Em relação à maturação de linfócitos no timo avaliamos marcadores de superfície CD4, o grupo DS apresentou uma queda de aproximadamente 40%, $2337,2 \pm 162,58$, em relação ao grupo ES, $3792,6 \pm 185,02$. Ao passo que, o grupo DT demonstrou um aumento de aproximadamente de 76%, $4094 \pm 101,43$ em relação ao grupo DS, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo ET, $4306,8 \pm 85,22$.

Figura 21. Citometria de CD4 do Timo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET.

Quanto à celularidade tímica, o grupo DS apresentou uma queda de aproximadamente 40%, $51,2 \pm 4,3 \times 10^7$, em relação ao grupo ES, $86,2 \pm 3,7 \times 10^7$. Ao passo que, o grupo DT demonstrou um aumento de aproximadamente de 106%, $108,7 \pm 4,1 \times 10^7$ em relação ao grupo DS, não apresentando diferença significativa menor em relação ao grupo ET, $138,3 \pm 9,1 \times 10^7$.

Figura 22. Citometria da celularidade do Timo. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). *p<0,05 em relação ao grupo ES. #p<0,05 em relação ao ET.

Avaliamos a proliferação de linfócitos no baço: houve diferença significativa entre os grupos sem e com a estimulação por mitógenos. O grupo DS apresentou uma queda de aproximadamente 40%, $1808,9 \pm 55,26$, em relação ao grupo ES, $2713,9 \pm 80,18$. Ao passo que, o grupo DT demonstrou um aumento de aproximadamente de 45%, $2655 \pm 86,85$ em relação ao grupo DS e apresentando diferença significativa em torno de 20% relação ao grupo ET, $2335,5 \pm 42,61$. Quando as células foram estimuladas com ConA o grupo DS demonstrou uma menor proliferação na razão de aproximadamente 80%, $3451,20 \pm 120,70$ em relação ao grupo ES, $7575,80 \pm 204,69$, enquanto que o grupo DT houve um significativo aumento na ordem de 1,8 vezes, $9207,50 \pm 137,23$ e de aproximadamente 10% sobre o grupo ET $8427 \pm 163,70$. Quanto à estimulação com LPS, o grupo DS apresentou uma resposta proliferativa de aproximadamente 25%, $4264,8 \pm 63,51$ em relação ao ES, $5360 \pm 117,6$. Entretanto, o grupo DT apresentou um aumento de 20%, $5113,4 \pm 81,7$ comparado ao grupo DS e de 15% ao grupo ET, $4575,8 \pm 50,45$. Dados interessantes foram observados quando as células foram estimuladas com IL2 tendo-se obtido diferenças nas respostas bastante significativas: células do grupo DS proliferaram 2,5 vezes menos, $2766,7 \pm 123,0$ em relação ao grupo ES, as quais do grupo DT proliferou aproximadamente 3,5 vezes mais, $10352,1 \pm 183,75$ do que as do grupo DS e 20% mais em relação ao grupo ET $10352,1 \pm 183,75$.

Figura 23. Proliferação das células do baço sem adição de mitógeno. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). *p<0,05 em relação ao grupo ES. #p<0,05 em relação ao ET, @ p<0,05em relação ao DS.

Figura 24. Proliferação das células do baço com adição de conA. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 25. Proliferação das células do baço com adição de LPS. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 26. Proliferação das células do baço com adição de IL2. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Em relação à proliferação de linfócitos em linfonodos demonstrou-se uma diferença significativa entre os grupos posto em condições basal, como após estimulação por mitógenos.

O grupo DS apresentou uma redução de aproximadamente 1,5 vezes, $4263,80 \pm 84,95$, em relação ao grupo ES, $10741,50 \pm 55,60$; enquanto que, o grupo DT demonstrou um aumento de aproximadamente de 100%, $9601 \pm 133,53$ em relação ao grupo DS apresentando ainda uma queda significativa em torno de 20% relação ao grupo ET, $11395,20 \pm 249,74$. Quando a estas células foram adicionadas o mitógeno ConA, o grupo DS demonstrou uma menor resposta proliferativa na razão de aproximadamente 3 vezes, $5032,30 \pm 233,65$ em relação ao grupo ES, $17650,80 \pm 109,34$, enquanto que o grupo DT houve um significativo aumento na ordem de 3,5 vezes, $18764 \pm 244,62$ e de aproximadamente 25% menor que o grupo ET $22340,90 \pm 373,30$. Quanto após a estimulação com LPS onde o grupo DS apresentou uma resposta proliferativa de aproximadamente 2,8 vezes menor, $5652,40 \pm 629,54$ em relação ao ES, $14046,10 \pm 84,35$. Entretanto, o grupo DT apresentou um aumento de 45%, $8229,20 \pm 246,91$ comparado ao grupo DS e de 100% ao grupo ET, $16770,80 \pm 341,50$. Quando as células foram estimuladas com IL2 a diferenças de respostas entre si foram bem marcantes, as células do grupo DS proliferou 4 vezes menos, $4444,80 \pm 322,09$ em relação ao grupo ES, ao passo que as do grupo DT proliferaram aproximadamente 4,5 vezes mais, $18764,1 \pm 1244,62$ entretanto ao grupo DS e 20% menores em relação ao grupo ET $23431,40 \pm 498,50$.

Figura 27. Proliferação das células dos linfonodos sem adição de mitógeno. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 28. Proliferação das células dos linfonodos com adição de LPS. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 29. Proliferação das células dos linfonodos com adição de ConA. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 30. Proliferação das células dos linfonodos com adição de IL2. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

4.3 Parâmetros metabólicos

Avaliamos alguns parâmetros metabólicos e notou-se uma redução na concentração de glicose plasmática no grupo DT em relação aos grupos ES, ET e uma maior glicemia em relação ao DS. Na figura 31 está ilustrada a glicemia dos grupos ES $129,12 \pm 14,93$ mg/dl, ET $120,71 \pm 15,94$ mg/dl, DS $92,37 \pm 12,95$ mg/dl e DT $117,18 \pm 38,40$ mg/dl. Não houve diferenças na insulinemia ilustrada na figura 32.

Quando comparamos a relação glicose/insulina houve uma redução em DT em comparação com DS e ET (Figura 33). Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico), que está descrita na figura 37.

A concentração plasmática de leptina para o grupo DS ($7,71 \pm 2,23$ ng/mL) foi concentração 3 vezes maior que a do grupo ES ($2,01 \pm 0,94$ ng/mL). Essa diferença foi ainda maior, na ordem de aproximadamente 6 vezes em relação ao grupo ET ($0,64 \pm 0,18$ ng/mL) e DT ($15,06 \pm 3,02$ ng/mL) como ilustração figura 34. Ainda avaliamos a concentração de glutamina: o grupo DS ($1204,18 \pm 81,99$ mM/mL) apresentou uma queda significativa em torno de 65% em relação ao ET ($2017,08 \pm 253,84$ mM/mL) e de 50% em relação ao grupo DT ($1976,96 \pm 260,24$ mM/mL), não apresentando diferença com o grupo ES ($86,2 \pm 3,7$ mM/mL), figura 37. O glutamato também apresentou diferença significativa entre os grupos, posto que o grupo DT ($2170 \pm 241,09$ mM/mL) apresentou uma elevação de aproximadamente 25% em relação aos grupos DS ($1701,01 \pm 20,9$ mM/mL) e de aproximadamente 20% em relação ao grupo ET, $1811 \pm 197,74$ mM/mL, não apresentaram diferenças entre os grupos DS e ES ($1385,3 \pm 273,75$ mM/mL), figura 35.

Figura 31. Concentração de glicose plasmática. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. , @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 32. Concentração de insulina plasmática. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10).

Figura 33. Relação insulina/glicose ([insulina] ($\mu\text{UI/ml}$) / [glicose] (mg/dl)). Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – $n=10$), Eutrófico treinado (ET- $n=10$), Desnutrido sedentário (DS – $n=10$), Desnutrido exercício (DT- $n=10$). # $p<0,05$ em relação ao grupo ET., @ $p<0,05$ em relação ao DS.

Figura 34. Concentração plasmática de leptina. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 35. Concentração plasmática de glutamato. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 36. Concentração plasmática de glutamina. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10). * $p < 0,05$ em relação ao grupo ES. # $p < 0,05$ em relação ao ET, @ $p < 0,05$ em relação ao DS.

Figura 37. Concentração plasmática de ACTH. Dados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Eutrófico sedentário (ES – n= 10), Eutrófico treinado (ET- n= 10), Desnutrido sedentário (DS – n= 10), Desnutrido exercício (DT- n= 10).

5 DISCUSSÃO

5.1 Desnutrição

A desnutrição é reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública dos países em desenvolvimento. Este quadro aparece quando as necessidades orgânicas para proteínas e energia, ou ambas, não são suficientes na dieta, ocasionando perda de peso e atraso no crescimento, que são as primeiras alterações detectáveis em crianças (MONTEIRO, 1984; ANJOS, 1989) e também em animais durante a fase de vida pré-amadurecimento sexual (Cunha et al., 2003).

Como resultado da desnutrição, há uma série de mudanças nas respostas fisiológicas e comportamentais que são consideradas como uma adaptação à disponibilidade de alimentos (SHETTY, 1999). Assim, esta habilidade de se adaptar não é só específica dos seres humanos, mas de quase todos os mamíferos e é como um duplo benefício à sua sobrevivência (SHETTY, 1999).

O controle do crescimento é consensualmente aceito como instrumento útil na avaliação do estado de saúde e nutrição em crianças (MONTEIRO, 1984) e em ratos (CUNHA et al., 2003). A pesquisa relacionada à sobre desnutrição investiga principalmente a desnutrição protéica, mas ainda poucos trabalhos enfocam a desnutrição protéico-calórica (BROWN, 1984; SOTO-MOYANO, R. et. al., 1987; SAVINO, 2002).

Então um dos objetivos principais do nosso trabalho foi observar como a desnutrição proteico-calórica provocaria certas mudanças corporais. Assim resolvemos adotar o protocolo de restrição de 50% da ingestão alimentar dos nossos ratos controles (ES) (CUNHA et al., 2003), que se mostrou adequado, resultando em desnutrição. Além do peso corporal, a diferença no tamanho dos animais foi significativa, indicando a eficácia (TORUN e VITERI, 1994; WATERLOW, 1994).

No presente trabalho escolhemos animais recém-desmamados para avaliar melhor os efeitos da privação do alimento sobre o crescimento. A redução de 50% na quantidade de alimento oferecida aos animais, a partir do 21º dia após o nascimento promoveu uma alteração de padrão

de ganho de peso corporal. Nossos animais desnutridos apresentaram uma diminuição na progressão do peso corporal e no final do período experimental, apresentaram uma redução de aproximadamente de 50% no seu peso corporal em relação aos grupos dos eutróficos (ES, ET). Essa diminuição na progressão e no peso final está de acordo com outros achados na literatura (ESCRIVÃ et al., 1992; MARTÍN, et al. 2007). O grupo eutrófico treinando (ET) apresentou um peso corporal 9,9% menor em relação ao grupo eutrófico sedentário e, após a segunda semana de treinamento, a progressão do peso corporal foi menor quando comparada com o grupo ES.

Em termos populacionais, a desnutrição protéico-calórica pode afetar todos os grupos etários, mas sua maior ocorrência é mais facilmente detectável em crianças e jovens, pois nestas populações a ocorrência de desnutrição está associada à dificuldade de obtenção de alimento pelos seus próprios meios, associada também com as poucas condições de higiene, aumentando a incidência de diarreia e outras infecções. Assim há esforços de pesquisadores dos países desenvolvidos em desenvolver fórmulas nutricionais mais acessíveis e eficientes para redução da desnutrição infantil (CAMPANA, 1985).

O desenvolvimento gradual do quadro de desnutrição pode ocorrer em semanas ou meses, passando por um período no qual há ajustes metabólicos e comportamentais que resultam numa adequação do metabolismo basal à nova demanda energética (YOUNG e SCRIMSHAW, 1971; SHETTY, 1999; CARBONNEL, 2000; EMERY, 2005).

Com a manutenção do estado de desnutrição, a queda no gasto energético não é mais suficiente para reequilibrar o sistema. Assim, têm início as alterações no metabolismo das gorduras e proteínas, que levam a uma rápida perda de peso e degradação progressiva dos estoques protéicos (CARBONNEL, 2005). Observamos uma queda acentuada na composição corporal dos animais do grupo desnutridos sedentários DS e desnutridos treinados DT avaliados pelo DEXA. Podemos observar uma queda em relação ao grupo ET de 42% tanto para o grupo DS e o grupo DT, valores esses para massa magra e 38% e 34%, respectivamente para densidade óssea.

Na verdade, em conjunto, os dados do DEXA mostraram uma redução muito acentuada na massa gorda, na ordem de 78% para os DS e 86% para os DT, corroboram os resultados de um experimento clássico realizado em 1940 na Universidade de Minnesota, que testou um grupo de voluntários e os colocou em restrição alimentar, ingerindo apenas 2/3 da dieta normal de um indivíduo (2400 kcal) por dia durante 24 semanas, resultando numa perda de pelo menos de 23%

do peso corporal desde o início do trabalho e da ordem de mais de 70% da massa de gordura em seu corpo (YOUNG e SCHRIMSHAW, 1971; HOFFER, 2001).

A desnutrição, geralmente, provoca atrofia muscular (GARLICK et al., 1975; WINICK, 1979), redução dos depósitos de gordura (SOARES e SHETTY, 1991; SHETTY, 1984; FERRO-LUZZI et al., 1997), e também, uma redução no tamanho do fígado (GARLICK 1975; ELIA, 1997). Corroborando os dados descritos na literatura, o peso absoluto do tecido muscular e adiposo e do fígado diminuiu nos desnutridos (DS e DT) em relação aos eutróficos (ES e ET), o que pode ser atribuído ao fato da massa corporal apresentada por eles ser cerca de 50% inferior.

Quando o animal está privado de alimento, além da perda de peso corporal, ocorre um balanço nitrogenado negativo, que pode levar a degradação protéica em diversos órgãos, em diferentes graus (GARLICK et al., 1975). O músculo esquelético pode ser um dos tecidos afetados pela diminuição da ingestão protéico-calórica (GOLDSPINK, 1964; GOLDSPINK, 1965; HENRIKSSON, 1990).

Além da redução de peso corporal, a desnutrição também promove um déficit de crescimento acentuado (BARAC-NIETO et al., 1978; SPURR et al., 1983), ou seja, um indivíduo desnutrido, geralmente, apresenta estatura menor do que indivíduos normais, o que também contribui para a redução do peso corporal total, fatos esses vistos pelo tamanho dos animais.

A desnutrição protéico-calórica é aceita como causa importante de imunodepressão e imunossupressão em um grande número de indivíduos, principalmente crianças em países em desenvolvimento responsável por mais de 50% das mortes em crianças com menos de 5 anos (MACCARTER et al., 1998). Em países industrializados também são descritos casos de desnutrição, porém com maior acometimento de idosos (REDMOND et al., 1991b; REDMOND et al., 1991c).

A relação entre estado nutricional e incidência de infecções do trato respiratório superior é demonstrada em um grande número estudos epidemiológica (ZAMAN et al., 1996), sendo aceito, que a desnutrição protéico-calórica ainda seja uma entre outra causa principal de imunodepressão e imunossupressão no mundo (REDMOND et al., 1995).

Como dito anteriormente, uma das importantes expressões da relação desnutrição e sistema imune amplamente descrita se baseia nas alterações observadas em componentes estruturais do sistema imunológico (MCMURRAY, 1984; BARONE et al., 1993; SAVINO,

2002). Entretanto as relações entre desnutrição e timo são relatados a partir de 1810; somente há pouco mais de 4 décadas foi descoberta a função imunológica do timo, e só mais recentemente estudos relacionando estrutura e função tímica têm sido consideradas a ser efetivamente retomada (DUROV, 1986; HADDEN, 1992; NEZELOF; 1992; LYRA. et.al., 1993; SAVINO, 2000; CHINEN, 2006).

A desnutrição é reconhecida como indutora da atrofia tímica determinando importantes mudanças estruturais e consequente perda de funções. Com atenuação das diferenças entre a zona cortical e medular de seus lóbulos. Nossos animais apresentaram notadamente uma atrofia no parênquima que se encontra espessada, com trabéculas também espessadas e irregulares e uma perda da angulação dos lóbulos, sendo que a diferenciação cortico-medular não foi mantida. Além disso, uma acentuada diferença no peso do órgão do grupo DS e DT foi observada, como também encontrados nos estudos de Dos-santos et al., 1999; Pallaro et al., 2001; Horsea et al., 2004 (dados não apresentados).

Além de alterar na morfologia tímica, outros estudos têm avaliado o impacto da desnutrição sobre a fisiologia tímica, principalmente na maturação de timócitos através de marcadores de superfície celular (LÓPEZ-VARELA et al., 2000; RODRÍGUEZ et al., 2005; COTÉZ-BARBERENA et al., 2008).

Em nossos estudos optamos por avaliar o CD3 que é um marcador de superfície celular e esta associado à transdução de sinal para os receptores de células T (TCR) e à maturação dos linfócitos T (STITES et al., 1994). Outro importante marcador é o CD4, cuja expressão está associada às populações T helper, promovendo a ativação e maturação de células B e células T citotóxicas, e ainda formando ainda uma ligação subsidiária com a classe II do MHC das células apresentadoras de antígenos (ROITT, 1993). Observamos uma queda na expressão de ambos CD3 e CD4 em relação ao nosso controle sugerindo uma redução na capacidade de maturação de células T pelo timo, dados esses também encontrados por Rodríguez et al., 2005; Cortéz-barberena et al., 2008.

Está bem estabelecido que o sistema imunológico está sob controle neuroendócrino (VILLA-VERDE, 1993; SAVINO e DARDENE, 2000). Neste contexto, estudos têm demonstrado que os glicocorticóides circulantes estão em níveis aumentados na desnutrição protéico-calórica comparados com o controle (Barone et al., 1993; Cunha et al., 2003, Cunha et al., 2004); e em

consequência outros estudos têm relatado uma severa depleção de timócitos (HADDEN, 1992; BARONE et al., 1993; FRAKER et al., 1995, ARTZ et al., 2000).

A leptina é um hormônio cuja expressão e secreção ocorrem primariamente no tecido adiposo branco, agindo através da ativação de isoformas específicas de receptores em vários tecidos (TARTAGLIA, 1997) e exibindo um ritmo circadiano, no qual as mais altas concentrações encontradas são próximas à meia noite e as mais baixas, próximo ao meio dia. (FRIEDMAN et al., 1998). Esse hormônio mostra um papel chave no controle da homeostase energética (CHAN e MANTZOROS, 2005). Estudos têm avançado no entendimento da fisiologia da leptina e estabelecido que o seu principal papel é no sinal da disponibilidade energética em estados de privação (HOULVER e HOUMARD, 2003; CHAN e MANTZOROS, 2005).

Outros estudos voltaram a sua atenção para o envolvimento desse hormônio com a regulação do sistema imunológico (HOWARD et al., 1999; SAVINO, 2002; MITO et al., 2004; SCHAIBLE e KAUFMANN, 2007). Hipotetiza-se que em estado de desnutrição há um desequilíbrio na produção de leptina, que seria responsável de proteger os órgãos linfóides (HOWARD et al., 1999; FANTUZZI e FAGGIONE, 2000; SAVINO, 2000; BLÜHER e MANTAZOROS, 2004).

Nossos estudos anteriores demonstraram um aumento da corticosterona com o estado de restrição alimentar e esse quadro se revertia com uma suplementação fisiológica de glutamina (CUNHA et al., 2003). Então avaliamos as concentrações de leptina depois do programa de restrição alimentar. Os resultados demonstraram um aumento de três vezes no grupos DS em relação ES, podendo sugerir que esse aumento teve um efeito compensatório para manutenção da estabilidade do peso corporal pelo fato de ser uma desnutrição crônica (GRUNFELD et al., 1996; MATARESE, G., 2000; FEARON e MOSES, 2002).

A desnutrição tem sido amplamente reconhecida como depressora e supressora em ambas as imunidades celular e humoral e é considerada ser um fator importante no aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas em pacientes normais ou hospitalizados (HUANG, 2001; WAITZBERG, 2001). A proliferação celular é muito sensível a mudança na disponibilidade de nutrientes e hormonal por essa razão pode esperar uma súbita mudança no sistema imunológico, que realiza uma rápida divisão celular e uma enorme síntese de proteínas, que pode se observada em animais privados de alimentos (CUNHA et al., 2003).

Em nossos estudos observamos que o sistema imunológico foi suprimido, quando ratos jovens foram expostos a um período de 30 dias restrição alimentar, tendo uma queda nas respostas proliferativa a mitógenos e na produção de citocinas dos linfonodos mesentéricos e do baço (CUNHA et al., 2003).

A interleucina2 (IL2) um fator de crescimento autócrino e parácrino secretada pelos linfócitos T é essencial para a proliferação clonal das células T, em virtude de sua habilidade de acentuar a mitogenese dos linfócitos humanos e suportar contínuo crescimento de células normais cultivadas (PAPIERNICK, 1984; JIANG et al., 1997; WAN e FLAVELL, 2006). Além disso, tem um papel crucial nas propriedades funcionais das células B, macrófagos e células natural killer NK, essa citocina se localiza como uma das mais críticas imunoreguladoras (PILLAI e KARANDIKAR, 2007). E por realizar um papel importante em múltiplos aspectos na biologia das células T (WAN e FLAVELL, 2006; BURCHILL et al., 2007; PILLAI e KARANDIKAR, 2007).

Estudos anteriores em nosso laboratório encontraram elevação da produção dessas citocina nos animais restritos de alimento, não somente em células cultivadas do baço, mas também nos linfonodos, dados esses corroborados com estudos de Zhang e Petro (1997).

As citocinas são moléculas sinalizadoras do sistema imunológico, que realizam um papel importante no controle da homeostase e seu equilíbrio modula o perfil (celular ou humoral) e a intensidade da resposta. A IL2 é uma citocina de resposta do tipo T-helper1(Th₁) e sua produção é importante na ativação de linfócitos T (DAMJANOVICH et. al., 2002).

Em nosso estudo, observamos que as células cultivadas do baço e dos linfonodos após estimulação com IL2 mostraram resultados semelhante ao das células estimuladas com ConA, havendo uma queda na resposta proliferativa no grupo DS esse fato pode estar relacionado a uma diminuição na função das células apresentadoras de antígenos, como foi descrito previamente por Zhang e Petro (1997) em seu modelo de desnutrição protéica e posteriormente visto por nosso grupo de trabalho (CUNHA et al., 2003; CUNHA et al., 2004).

Uma menor resposta proliferativa dos linfócitos cultivados das células do baço e dos linfonodos encontrados no grupo DS em resposta ao estímulo com IL2 e a mitógenos reforça a hipótese de diminuição na função das células apresentadoras de antígenos (ZHANG e PETRO, 1994; CUNHA et al., 2003).

Algumas teorias ligam o metabolismo de amônia e dos aminoácidos à fadiga central e periférica que acompanham os exercícios de longa duração. Assim, pode-se imaginar que o metabolismo dos aminoácidos desempenha um papel de destaque na adaptação ao treinamento de endurance (GRAHAM et al., 1997; SANTOS, 2004).

Os efeitos do treinamento sobre o metabolismo muscular fazem com que esse tecido apresente alterações no metabolismo dos aminoácidos durante o exercício (DUDDLEY e TERJUNG, 1985). No entanto, quando esses estudos são realizados com seres humanos, eles são limitados pela ética a avaliações em parâmetros de flutuações das concentrações plasmáticas do aminoácido e os estudos em animais ficam um pouco difíceis a extrapolação (GRAHAM et al., 1997; SANTOS, 2004).

A glutamina é um aminoácido condicionalmente essencial, que compreende 20% do total de aminoácidos plasmático e é ativamente produzido em diferentes órgãos como fígado, rins, pulmões e músculo esquelético sob diferentes condições patológicas. Sendo o músculo esquelético seu maior produtor pode liberá-lo na corrente sanguínea em altas taxas (NEWSHOLME, 1994; NEWSHOLME, 1996; NEWSHOLME e CALDER, 1997,). Além disso, é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia e indispensável para a síntese protéica, constituindo-se em um importante substrato energético para as células do sistema imunológico (ROWBOTTON et al., 1996).

Em nossos estudos resolvemos investigar os efeitos da restrição alimentar sobre as concentrações deste aminoácido no plasma, que é elevado estado de jejum de 48h, paralelamente pela redução na atividade da glutaminase e um aumento na produção pelo fígado (KONG et al., 2000).

Estas mudanças não foram observadas em nosso trabalho no qual houve uma queda no grupo DS. Essas mudanças têm um papel importante, atribuindo a sua queda ao fato de muito tecidos poderem estar usando a glutamina como substrato, entre eles os rins e fígado para gliconeogênese (BOZA et al., 2001).

Efeito do treinamento

O treinamento físico também é considerado um clássico indutor de redução do peso corporal, por aumentar o gasto energético do indivíduo, proveniente de fontes armazenadas no

corpo, como por exemplo, os depósitos de gordura do tecido adiposo, (ROSS et al., 2000; ROSS et al., 2004). Essa resposta também foi notada em nosso modelo, já que o treinamento foi capaz de promover uma redução de peso corporal do grupo eutrófico treinado (ET) em relação ao eutrófico sedentário (ES). Apesar do peso corporal do ET ser significativamente menor em relação ao ES, a ingestão alimentar não foi menor, demonstrando efetivo efeito do treinamento de endurance. Isso vem de acordo com um balanço energético negativo promovido pelo aumento do gasto energético pelo treinamento físico e manutenção da ingestão alimentar.

Mas, contrariamente, o grupo desnutrido treinado DT não apresentou uma redução do peso corporal em relação ao desnutrido sedentário (DS), demonstrando que o treinamento associado à desnutrição não é capaz de acentuar, ainda mais, a redução do peso corporal, sugerindo um efeito preservador do treinamento frente à perda de peso promovida pela desnutrição e sugerindo que o exercício promoveu uma preservação da massa magra (TORUN e VITERI, 1989; KRITCHEVSKY, 1990; TORUN e VITERI, 1993; HOYT e FRIEDL, 2006).

O objetivo primário de um programa de treinamento físico é conferir ao organismo uma melhor capacidade de adaptação a situações de estresse. O desvio da situação de homeostase produzida pelo exercício físico induz uma reorganização de seus mecanismos funcionais, principalmente os mecanismos endócrinos e imunológicos (LARSEN, 2003; CUNHA et al., 2004).

Um assunto que vem chamando bastante atenção é a relação entre o indivíduo privado de alimento e seu desempenho atlético (COETZER et al., 1993; LARSEN, 2003), e um dado muito interessante é o domínio, em termos de resultados, das corridas de longa distância por atletas de países que sofrem bastante com a desnutrição (COETZER et al., 1993; SALTIN et al., 1995; LARSEN, 2004; LUCIA et al., 2006). Em nosso estudo encontramos um melhor desempenho para os animais desnutridos, que obtiveram melhores resultados no teste de exaustão e de VO_2 . Esses dados mostraram-se relevantes na discussão do paradoxo dos corredores de países como Kenia e Etiópia, que são assolados pela escassez de alimentos para sua população (COETZER et al., 1993; SALTIN et al., 1995a; SALTIN et al., 1995b; LARSEN, 2003; LARSEN et al., 2004; LUCIA et al., 2006).

Sabe-se que durante o exercício físico de endurance, as células musculares são abastecidas por substratos armazenados em seu interior como o glicogênio e o triacilglicerol e circulatórios como a glicose e os ácidos graxos. As mitocôndrias, por sua vez, consomem mais rapidamente os substratos que estão armazenados no próprio músculo do que os circulatórios (HOPPELER e BILLETER, 1991).

A concentração do glicogênio muscular possui uma relação direta com a intensidade do exercício e, desta forma, um indivíduo com maior estoque de glicogênio é capaz de realizar exercício em intensidades maiores (BERGSTROM et al., 1967). Além disso, durante o exercício de endurance, quanto maior a capacidade do indivíduo em captar, transportar e consumir o oxigênio, ou seja, quanto melhor sua capacidade funcional cardiorrespiratória medida através do $VO_{2máx}$, melhor será seu desempenho (BASSET e HOWLEY, 2000). Notamos que os animais do grupo desnutrido treinado (DT), além de apresentarem uma maior concentração de glicogênio muscular, apresentaram também um melhor $VO_{2máx}$ do que os eutrófico sedentário e treinado (ES e ET) e os desnutridos sedentários. O consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$) desse grupo, após 10 semanas de treinamento, foi significativamente maior do que seu grupo controle que também treinou o eutrófico treinado (ET).

Diferentemente, em um estudo realizado por BARAC-NIETO et al. (1978) com 49 indivíduos adultos desnutridos, demonstrou-se que o $VO_{2máx}$ desses indivíduos era menor comparado a indivíduos normais, porém, foi demonstrado posteriormente pelo mesmo grupo que essa redução do $VO_{2máx}$ estava relacionada à reduzida massa muscular apresentada pelos desnutridos, o que não ocorreu com os desnutridos treinados em nosso modelo experimental e, talvez, por isso o maior $VO_{2máx}$ apresentado por eles.

Em outro estudo do grupo, foi que, com a renutrição com uma dieta rica em proteínas durante 45 dias, houve um aumento da massa muscular e do $VO_{2máx}$ em indivíduos desnutridos, demonstrando a importância desse componente para um melhor consumo de oxigênio (BARAC-NIETO et al., 1980). Mais adiante, Spurr et al. (1983) publicaram que crianças de 6 a 16 anos de idade desnutridas, apresentavam um menor $VO_{2máx}$ do que crianças consideradas normais. Por outro lado, em outro estudo publicado posteriormente por Spurr e colaboradores (1984) com crianças, demonstrou-se que as consideradas desnutridas apresentaram um melhor consumo de oxigênio em uma carga submáxima de exercício do que crianças normais. Parece então que a

massa muscular não diminuída do grupo desnutrido treinado (DT) em relação ao seu peso corporal, pode ser a responsável pelo maior $VO_{2máx}$.

Além de um maior $VO_{2máx}$, os animais DT apresentaram, curiosamente, um melhor desempenho de corrida na esteira do que todos os outros grupos. Isso ocorreu tanto em relação ao tempo até a exaustão, quanto à velocidade atingida no momento da fadiga. O grupo eutrófico treinado (ET) também apresentou o mesmo resultado em relação aos grupos sedentários (ES e DS), demonstrando um efeito positivo do treinamento de endurance de 10 semanas aplicado. O grupo desnutrido treinado (DT) demorou 36,36% mais tempo para entrar em exaustão do que o eutrófico treinado (ET), ou seja, 13,4 minutos a mais para chegar à fadiga. Afora, demorou 69,8 e 72,11% mais tempo até a exaustão do que os grupos eutrófico e desnutrido sedentário (ES e DS), respectivamente.

Também atingindo 20,4% maior velocidade de corrida no momento da exaustão do que o grupo ET, mais de 10m/min. mais veloz. Além disso, também atingiu 53,8 e 53,3% maior velocidade do que os grupos ES e DS, respectivamente. De forma oposta, o estudo de BARAC-NIETO et al. (1978), realizado com humanos, demonstrou que a capacidade de endurance, ou seja, a resistência à exaustão de desnutridos, a 80% do $VO_{2máx}$, não foi diferente a indivíduos normais. Porém, diferentemente do nosso modelo, os indivíduos desnutridos eram sedentários e, portanto, assemelhando-se aos resultados encontrados entre os grupos eutrófico sedentário (ES) e desnutrido sedentário (DS), que após 10 semanas sem treinamento, também não apresentaram diferenças em relação à resistência a exaustão. Não foram encontrados estudos em que desnutridos foram submetidos a um período de treinamento e depois avaliados quanto ao desempenho.

Sabidamente um bom desempenho em exercícios de endurance é dependente de variáveis como a composição corporal, o conteúdo de glicogênio muscular, o $VO_{2máx}$, e também depende da capacidade oxidativa do músculo esquelético de ressintetizar ATP para a continuação do exercício. Como já discutido anteriormente, sabe-se que além do glicogênio muscular e da glicose sangüínea, os ácidos graxos também são importantes substratos energéticos para a produção de ATP durante a realização de exercícios de endurance.

Assim, as principais vias metabólicas de geração de ATP durante o exercício prolongado de intensidade moderada são a glicólise aeróbia no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de elétrons, e a β -oxidação dos ácidos graxos, onde essas reações que ocorrem para a geração do ATP são catalisadas por diversas enzimas. Além disso, sabe-se que tanto a desnutrição quanto o treinamento físico são capazes de promover uma série de adaptações fisiológicas e bioquímicas no músculo esquelético (FUGE et al., 1968; BRUCE et al., 1984; OLDORFS e SOURANDER, 1984; DE-MELLO, 1994; CIVITARESE, 2007).

Dessa forma, o imenso potencial do exercício em várias condições parece estar correlacionado ao fato de que pode promover adaptações em todos os sistemas, este conceito sobre os efeitos benéficos na saúde humana é completamente novo (COSTA ROSA, 2004). No passado os médicos tradicionalmente avisam seus pacientes com doenças crônicas evitarem a atividade física. Contudo, as investigações desenvolvidas nos programas de reabilitação cardíaca a partir de 1960, serviram como ponto de partida para as pesquisas sobre os efeitos do exercício sobre os sistemas e processos patofisiológicos como as respostas imunológicas, câncer e a inflamação (COSTA ROSA, 2004).

A estrutura do timo dos animais desnutridos treinados (DT) , assemelhou-se a situação controle, sugerindo que a recuperação da morfologia poderia estar associada à recuperação funcional (WOODS et al., 2003).

Resolvemos avaliar o comportamento dos marcadores de superfície celular no exercício, sabendo que na literatura há relatos sobre exercício agudo (SIMPSON et al., 2007; LAING et al., 2008). Nossos estudos revelaram um aumento na expressão de CD3 timo no DT em relação DS sugerindo assim uma recuperação na maturação das células T, tendo observado um incremento na expressão de CD4 confirmando estudos anteriores em nosso laboratório, que o exercício promoveu uma resposta imunológica tipo Th1 (CUNHA et al., 2004).

Anteriormente comentado estudos têm também voltado a sua atenção para o envolvimento da leptina sobre o sistema imunológico (HOWARD et al., 1999; SAVINO, 2002; MITO et al., 2004; SCHAIBLE e KAUFMANN, 2007). A hipótese de que em estado de desnutrição ha um desequilíbrio na produção de leptina, que seria responsável de proteger os órgãos linfóides (FANTUZZI e FAGGIONE, 2000; SAVINO, 2000; BLÜHER e

MANTAZOROS, 2004) e exercício (FILTEAU et al., 1992; MACKINON, 1998; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; MATTHEW e HOUMARD, 2003; COSTA ROSA, 2004).

Nossos estudos anteriores demonstraram um aumento da corticosterona com o estado de restrição alimentar e esse quadro se revertia com o exercício crônico moderado (CUNHA et al., 2004). Então avaliamos o comportamento das concentrações de leptina depois do programa de treinamento, e essas não diferiram entre os grupos ES, ET, porém houve uma elevação de aproximadamente 6,5 vezes nos desnutridos treinados esses dados em conjunto sugerem uma recuperação na funcionalidade do timo descrita por Savino (2002) e Hebebrand et al.(2003). Porém, como dito anteriormente, sugerimos que esse aumento pode ter sido um efeito compensatório para manutenção da estabilidade do peso corporal pelo fato de ser uma desnutrição crônica (GRUNFELD et al., 1996; GRUNFELD et al., 1997; FRIELD et al., 2000; FEARON e MOSES, 2002).

O exercício foi capaz de reduzir em DT os níveis de glicocorticóide, hormônios pro-apoptóticos responsáveis pela depleção dos timócitos e atrofia tímica e ainda promoveu uma elevação nas concentrações de leptina, que é um hormônios anti-apoptóticos, sugerindo uma recuperação da funcionalidade e possível repovoamento dos órgãos linfóides periféricos (HOWARD et al., 1999; CHACÓN et al., 2005).

Sabendo que IL2 é um importante fator de crescimento e estudos têm revelado seu papel como uma sinalizadora no desenvolvimento e homeostase das células T (BURCHILL et al., 2007; PILLAI e KARANDIKAR, 2007), resolvemos avaliar o efeito desta citocina na resposta proliferativa delas.

No grupo DT, o exercício foi capaz de restabelecer as funções imunológicas, tanto no baço quanto nos linfonodos, recuperando a capacidade de proliferar em resposta a concanavalina A (ConA) e a IL2 em comparação ao grupo ET. O efeito do exercício sobre a proliferação dos leucócitos é conhecido e varia de acordo com duração, intensidade e o tipo de exercício, como descrito por Fry et al. (1992) e demonstrado por outros pesquisadores como Nieman et al. (1992), Pedersen e Hoffman-Goetz, (2000); Santos, (2004). Em nosso modelo o exercício foi capaz de restaurar a resposta proliferativa e havendo maior responsividade do grupo DT a IL2 reforça uma resposta imunológica tipo Th₁.

O programa de treinamento induziu uma recuperação parcial das concentrações plasmáticas de glutamina, como demonstrado num estudo previamente conduzido em nosso laboratório em

que a adição de glutamina ao meio de cultura de linfócitos obtidos de ratos desnutridos, que mostraram uma queda na concentração plasmática do aminoácido, restaurou a habilidade de produzir citocinas e proliferar em resposta à ConA (CUNHA et al., 2003).

Assim, podemos especular que o exercício foi capaz de recuperar as concentrações da glutamina plasmática explicando, parcialmente, a recuperação da função do sistema imunológico em nosso trabalho. As alterações no fluxo de glutamina podem, contudo também estar relacionadas às mudanças nas concentrações de glicocorticóides (CUNHA et al., 2004).

Trabalhos prévios chamam atenção para os efeitos fisiológicos das baixas concentrações de glutamina, mas não relacionam o estado de desnutrição e sua relação com o exercício. Sabendo que o exercício afeta todos os tecidos e sistemas no corpo humano, interagindo e modulando por um sistema psiconeuroimunoendócrino (COSTA ROSA, 2004).

A recuperação da concentração plasmática de glutamina e da função tímica sugerem que um programa de treinamento pode ser usado como uma estratégia coadjuvante de tratamento da desnutrição, reduzindo custos em políticas públicas de saúde, aumentando a qualidade de vida.

6 CONCLUSÃO

Podemos concluir que a desnutrição ocasiona uma alteração no sistema imunológico acarretando uma atrofia tímica e mudanças tanto na morfologia, quanto na sua funcionalidade reduzindo a celularidade e a maturação de timócitos. Além disso, ela provocou uma menor resposta proliferativa dos linfócitos do baço e linfonodos submetidos à estimulação. O programa de exercício moderado crônico adotado demonstrou ser eficiente em reverter uma série de anormalidades na morfologia do timo, bem como recuperar sua capacidade funcional através do aumento da celularidade e do aumento na maturação de timócitos CD3 e CD4, fato que pode estar associado pelo menos pela redução da corticosterona e um aumento da leptina. E ainda, o exercício se mostrou capaz de restaurar a resposta proliferativa do baço e linfonodos a IL2 uma citocina que tem um papel crítico como efetora e supressora do sistema imunológico. Adicionalmente o treinamento promoveu a recuperação dos níveis de glutamina plasmática.

Portanto, um programa de treinamento de intensidade moderada e crônico (55-65% $\text{VO}_{2\text{max}}$) pode ser uma alternativa terapêutica adicional, que pode ser administrado em alguns quadros patológicos entre eles a desnutrição, a baixos custos e elevando a qualidade de vida da população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALTMAN, A. The syndrome of malignant malnutrition (kwashiorkor: Infantile Pellegra) Its conception as a protein deficiency and its treatment with skimmed lactic acid milk. **Clinical Proceeding**, v.7, n.1, p. 32-53, 1948.

ANJOS, L.A. Indices antropométricos e estado nutricional de escolares de baixa renda de um município do Estado do Rio de Janeiro rio: um estudo piloto. **Revista de Saúde Pública**, v. 23, p. 221-9, 1989.

ANJOS , L.A. et al. Indicadores de gordura corporal em crianças de 7 a 11 anos de idade vivendo em condições sócio-ambientais diferentes no Rio de Janeiro(Barsil): um estudo piloto. **Revista de Ciência e Cultura**, v. 41, n.12, p. 1179-1188, 1989.

AZENABOR, A. A.; HOFFMAN-GOETZ, L. Intrathymic and intrasplenic oxidative stress mediates thymocytes and splenocytes damage in acutely in exercised mice. **Journal Applied Physiology**, v.86, p. 1823-1827, 1999.

BACURAU, R.F.P. et al. Carbohydrate supplementation during intense exercise and the immune response of cyclists. **Clinical Nutrition**, v. 21, p. 423-429, 2002.

BARAC-NIETO, M. **et al.** Aerobic work capacity in chronically undernourished adult males. **Journal of Applied Physiology**, v.44, n.2, p. 209-215, 1978.

BARAC-NIETO, M.; SPURR, G.B.; DAHNERS, H.W.; MAKSOUD, M.G. Aerobic work capacity and endurance during nutritional repletion of severely undernourished men. **American Journal of Clinical Nutriton**, v. 33, p. 2268-2275, 1980

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARNARD, A. et al. Impact of the neuroendocrine system on thymus and bone marrow function. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n.1, p. 7-18, 2008.

BARONE, K.S.; O'BRIEN, P.C.; STEVENSON, J.R. Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. **Cellular Immunology**, v.148, p. 226-233, 1993.

BASSET, D.R.; HOWLEY, E.T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 32, n.1, p. 70-84, 2000.

BASSIT R.A. et al. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. **Medicine and Sciences in Sports and Exercise**, v. 32, p. 1214-1219, 2000.

BERGSTROM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, F.; SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 71, p. 140-150, 1967.

BLÜHER, S.; MANTZOROS, C. The role of leptin in regulation neuroendocrine function in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p.2469s-2474s, 2004.

BROWN, M.S. Health care in Africa. **Nurse Practitioners**, v. 9, n.7, p. 38-43, 1984.

BURCHILL, M.A. et al. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. **Immunology Letters**, v. 114, p. 1-8, 2007.

CALDER, P.; KEW, S. the immune system : a target for functional food? **British the Journal of Nutrition**, v. 88, p. s 165-77, 2002. Suppl. 2.

CAMPANA, A.P. **Características antropométricas de escolares e suas relações com o Status sócio-econômico e nível intelectual**. Tese (Livre-Docência) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1985.

CARBONNEL, F. L'adaptation métabolique à la dénutrition. **Annales de Médecine Interne**, v. 151, n.8, p. 644-651, 2000.

CASTELL, L. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and immunodepression. **Sports Medicine**, v. 33, p. 323-345, 2003.

CEDEHOLM, T.; GYLLENHAMAR, H. Impaired granulocyte formylpeptide-induced superoxide generation in chronically ill, malnourished, elderly patients. **Journal of Internal Medicine**, v. 245, p. 475-482, 1999.

CHACON, F. et al. 24-hour changes in ACTH, corticosterone, growth hormone, and leptin levels in young male rats subjected to calorie restriction. **Chronobiology International**, v. 22, n.2, p. 253-265, 2005.

CHAN, J.L; MANTZOROS, C.S. Role of leptin in energy-deprivation state: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. **Lancet**, v. 366, p. 74-85, 2005.

CHANDRA, R.K. **Protein-energy desnutrition and immunological responses. The Journal of Nutrition**, v. 122, n. 3, p. 597-600, 1992. Suppl. 1.

CHANDRA, R.K. Nutrition, immunity and infection: from basic knowledge of dietary manipulation of immune responses to practical application of ameliorating and improving survival. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 93, p. 14304-14307, 1996.

CHANDRA, R.K. 1990 McCollum award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.53, p. 1087-1101, 1991.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system : an introduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 460S-463S, 1997.

CHANDRA, R.K. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 58, p. 681-683, 1999.

- CHATRAW, J.H. et al. Ahmed, R.; Kapasi, Z.F. Diminished primary CD8 T cell response to viral infection during protein energy malnutrition in mice is due to changes in microenvironment and low numbers viral-specific CD8 T cell precursors. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n.4, p. 806-12, 2008.
- CHINEN, J.; SHEARER, W.T. Advances in asthma, allergy and immunology series 2004: Basic and Clinical Immunology. **Basic and Clinical Immunology**, v. 114, n.2, p. 398-405, 2004.
- CHINEN, J.; FINKELMAN, F.; SHEARER, W.T. Advances in asthma, allergy and immunology series 2006: Advances Basic and Clinical Immunology. **Basic and Clinical Immunology**, v.118, n.2, p. 489-495, 2006.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, n.162, p. 156-159, 1987.
- CONZEN, S.D.; JANEWAY, C.A. Defective antigen presentation in chronically protein-deprived mice. **Immunology**, v.63, n.4, p.: 683-689, 1988.
- COETZER, P. et al. Superior fatigue resistance of elite black South African distance runners. **Journal Applied Physiology**, v. 75, p. 1822-1827, 1993.
- CORTÉS-BARBARENA, E. et al. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 152, p. 585-592, 2008.
- COTTA DE ALMEIDA, V. et al. Impaired migration of NOD mouse thymocytes: a fibronectin receptor-related defect. **European Journal of Immunology**, v.34, n.6, p. 1578-87, 2004.
- CRIST, D.M.; MACKINNON, L.T.; THOMPSON, R.F. Physical exercise increases natural cellular –mediated tumor cytotoxicity in elderly women. **Gerontology**, v.35, n. 66-71, 1989.
- COSTA ROSA, L.F.B. Exercise as a time-conditioning effector in chronic disease: a complementary treatment strategy. **Evidence-based Complement and Alternative Medicine**, v.1, n.1, p. 63-70, 2004.

CUNHA, W.D.S. et al. Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. **Clinical Nutrition**, v.22, p. 453-457, 2003.

CUNHA, W.D.S. et al. Exercise restores immune cell function in under nourished rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.36, n.12, p. 2059-64, 2004.

CUNNINGHAM-RUDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanism of nutrient modulation of the immune response. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.115, n.6, p. 1119-28, 2005.

CUPPS, T.R.; FAUCI, A.S. Corticosteroid mediated immunoregulation in man. **Immunological Reviews**, v.65, p. 133-155, 1982.

CURFS, J.H.J.A.; MEIS, J.F.G.M.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A. A primer on cytokine: Source, Receptors, Effects, and Inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n.4, p. 742-780, 1997.

CURI, R. et al. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p. 15-21, 1999.

DALMAU, S.R.; FREITAS, C.S.; SAVINO, W. High expression of fibronectin receptors and L-selectin as a hallmark of early steps of thymocyte differentiation: lessons from sublethally irradiated mice. **Blood**, v.93, p. 974-990, 1999.

DAMJANOVICH, S. et al. Does mosaicism of the plasma membrane at molecular and higher hierarchical levels in human lymphocytes carry information on the immediate history cells? **Immunology Letters**, v. 8, n. 1-2, p. 93-99, 2002.

DE-MELLO, M.A. Effects of intrauterine and postnatal protein-calorie malnutrition on metabolic adaptations to exercise in young rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, n.8, p. 713-7, 1990.

DESAI, I.D. et al. Marginal malnutrition and reduced physical work capacity of migrant adolescent boys in southern Brazil. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.40, p. 135-145, 1984.

DHUR, A. et al. Effect of folic acid deficiency upon lymphocyte subsets from lymphoid organs in mice. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, v. A 98, p.235-240, 1991.

DOHERTY, J.F. et al. Production of interleukin-6 and tumour necrosis factor- α *in vitro* is reduced in whole blood of severely malnourished children. **Clinical Science**, v.86, p. 347-351, 1994.

DOS-SANTOS, M.A. et al. Effect of the protein malnutrition on the glycolytic and glutaminolytic enzyme activity of rats thymus and mesenteric lymph nodes. **Brazilian Journal of Medicine and Bbiology Reasearch**, v.30, n.6, p. 719-22, 1997.

DOUROV, N. Thymic atrophy and immune deficiency in malnutrition. **Current Topics Pathology**, v.75, p. 127-50, 1986.

EDWARDS, K.M. et al. The acute stress-induced immunoenhancement hypothesis. **Exercise and Sports Science Reviews**, v.35, n.3, p. 150-5, 2007.

ELIA, M. Tissue distribution and energetics in weight loss and undernutrition. In: KINNEY, J.M.; TUCKER, H.N. (Ed.). **Physiology, stress and malnutrition: functional correlates, nutritional intervention**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 383-411.

EMERY, P.W. Metabolic changes in malnutrition. **Eye**, v.19, p.1029-1034, 2005.

ESCRIVÁ, E. et al. glucose utilization and insulin action in adults rats submitted to prolonged food restriction. **The American Journal of Physiology**, v.263, p. 1-7, 1992.

FANTUZZI, G.; FAGGIONI, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. **Journal of Leukocytes Biology**, v.68, p. 431- 446, 2000.

FEARON, K.C.; MOSES, A.G. Cancer and cachexia. **International Journal of Cardiology**, v. 85, n.1, p. 73-81, 2002.

FEBBRAIO, M.A. Exercise and inflammation. **Journal Applied Physiology**, v.103, p. 376-377, 2007.

FERRO-LUZZI, A.; PETRACHI, C.; KURIYAN, R.; KURPAD, A.V. Basal metabolism of eight stable chronically undernourished men and women, lack of metabolic adaptation and ethnic differences. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 1086-1093, 1997.

FERRY, A. et al. Effect of moderate exercise on rat T-cells. **European Journal of Applied Physiology**, v.65, n.5, p. 464-468, 1992.

FILTEAU, S.M. et al. Effect of exercise on immune functions of undernourished mice. **Life Science**, v.51, n.8, p. 565-74, 1992.

FLÓ, J.; ELIAS, F.; BENEDETTI, R.; MASSOUH, E. : Reversible effects on B and T cells of the gut-associated lymphoid tissues in rats malnourished during suckling: Impaired induction of the immune response to intra-Peyer patches immunization with Cholera toxin. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.80, n. 2, p. 147-154, 1996.

FOK, R.A. et al. Protein-energy malnutrition decrease the expression of TLR-4/MD2 and CD14 receptors in peritoneal macrophage and reduces the synthesis of TNF- α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokines**, v. 40, p. 105-114, 2007.

FRAKER, P.J. et al. Possible roles for glucorticoids and apoptosis in the suppression of the lymphopoiesis during zinc deficiency: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v.14, n.1, p. 11-7, 1995.

FRIES, J.F. et al. Relationship of running to musculoskeletal pain with age. **Arthritis & Rheumatism**, v.39, n. 1, p. 64-72, 1996.

FRY, R.W.; MORTON, A.R.; KEAST, D. Acute intensive interval training and T lymphocyte function. **Medicine Sciences in Sport and Exercise**, v.24, p. 339-345, 1992.

FUGE, K.W.; CREWS III, E.L.; PATTENGAL, P.K.; HOLLOZSY, J.O.; SHANK, R.E. Effects of protein deficiency on certain adaptive responses to exercise. **American Journal of Physiology**. v.215, p. 660-663, 1968.

GABRIEL, H.; URHAUSEN, A.; KINDERMAN, W. : Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short anaerobic exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v.65, p. 164-170, 1992.

GABRIEL, H.; URHAUSEN, A.; KINDERMAN, W. Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion . **European Journal of Applied Physiology**, v.63, p. 449- 457, 1991.

GARLICK, P.J.; MILLWARD, D.J.; JAMES, W.P.T.; WATERLOW, J.C. The effect of protein deprivation and starvation on the rate of protein synthesis in tissues of the rat. **Biochimical Biophysics Acta**, v. 414, p. 71-84, 1975.

GLEESON, M.; NIEMAN, D.C.; PEDERSEN, B.K. Exercise, nutrition and immune function. **The Journal of Sports Science**, v.22, n.1, p. 115-25, 2004.

GOLDSPINK, G. Cytological basis of decrease in muscle strength during starvation. **American Journal Physiology**, v. 209, p. 100-104, 1965.

GOLDSPINK, G. The combined effects of exercise and reduced food intake on skeletal muscle fibres. **Journal Cell Comparative and Physiology**, v. 63, n. 209-216, 1964.

GONZALEZ-MARTÍNEZ, H. et al. Expression of cytokines mRNA in lymphocytes of malnourished children. **Journal of Clinical Immunology**, v. 28, p. 593-599, 2008.

GUILLEMIN, R, W.G. et al. Lipscomb. Measurement of free corticosteroids in rat plasma, physiological validation of a method. **Endocrinology**, v. 63, p. 349–357, 1958.

GRUNFELD, C. et al. serum leptin levels in the acquire immunodeficiency syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 81, n.12, p. 4342-6, 1996.

GRUNFELD, C. leptin and the immunosuppression of malnutrition. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n.7, p. 3038-3039, 2002.

HADDEN, J.W. Thymic endocrinoly. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, n.3, p. 345-352, 1992.

HARTMAN, E.H.M. et al. Demineralized bone matrix-induced ectopic bone formation in rats: In vivo study with follow-up by magnetic resonance imaging, magnetic resonance angiography, and dual-energy X-ray absorptiometry. **Tissue Engineering**, v. 10, n.5/6, p. 747-755, 2004.

HAYNE, H.; BONIFACE, J.; BARR, R. The development of declarative memory in human infant: age-related change in deferred imitation. **Behavior Neuroscience**, v. 114, n.1, p. 77-83, 2000.

HEIMBURGUER, D.C.; MORGAN, S.L. Kwashiorkor: dysmetabolism versus malnutrition. **Nutrition and Clinical Practice**, v. 18, n.4, p. 297-301, 2003.

HENRIKSSON, J. The possible role of skeletal muscle in the adaptation to periods of energy deficiency. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 44, p. 55-64, 1990.

HIROKAWA, K. Reversing and restoring immune functions. **Mechanisms of Aging and Development**, v. 93, p. 119-124, 1997.

HOFFER, L.J. Clinical Nutrition 1: protein-energy malnutrition in the inpatient. **Canadian Medical Association Journal**, v. 165, n.10, p. 1345-9, 2001.

HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise, natural immunity, and tumor metastasis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.26, n. 2, p. 157-63, 1994.

HOFFMAN-GOETZ, L.; KEIR, R.; YOUNG, C.: Modulation of cellular immunity in malnutrition: effect of interleukin 1 on suppressor T cell activity. **Clinical and Experimental Immunology**, v.65, n. 2, p. 381-386, 1986.

HOSEA, H.J.; RECTOR, E.S.; TAYLOR, C.G. Dietary repletion can replenish reduce T cell subset numbers and lymphoid organ weight in zinc-deficient energy-restricted rats. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 741-747, 2004.

HORSKÁ, A. et al. Effect of long-term caloric restriction and exercise on muscle bioenergetics and force development in rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 276, p. 766-773, 1999.

HOWARD, J.K. et al. Leptin protect mice from starved-induced lymphoid atrophy and increased thymic cellularity in ob/ob mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n.8, p. 1051-9, 1999.

HOYT, R.W.; FRIEDL, K.E. Field studies of exercise and food deprivation. **Current Opinion in Clinical Nutritional and Metabolic Care**, v. 9, p. 685-690, 2006.

HUANG, Y. Malnutrition in the critically ill. **Nutrition**, v. 17, p. 744-746, 2001.

HULVER, M.W.; HOUMARD, J.A. Plasma leptin and exercise. **Sports Medicine**, v.33, n.2, p.473-482, 2003.

KENDALL, A.; HOFFMAN-GOETZ, L.; HOUSTON, M. Exercise and blood lymphocyte subset responses : Intensity, duration, and subject fitness effects. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, p. 251-260, 1990.

KHAN, M.M.; SAMSONI, P.; SILVERMAN, E.D. Beta-adrenergic receptors on human supressor, helper, and cytolytic lymphocytes. **Biochemical Pharmacology**, v.35, p. 1137-1142, 1986.

KIMURA, M. et al. Long-term exercise down-regulates leptin receptor mRNA in the arcuate nucleus. **Neurorepots**, v.15, p. 713-716, 2004.

KINTZEL, J.A.; DEAK, T.; FLESHNER, M.: The effect of voluntary wheel exercise training and inescapable tailshock on bacterial susceptibility. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.30, n. 5 s, p. s22, 1998.

KRITCHECHEVSKY, D. Influence of caloric restriction and exercise on tumorigenesis in rats. **Proceeding of the Society Experimental for Biology and Medicine**, v.193, n. 1, p. 35-38, 1990.

KRÜGER, K. et al. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. **Brain Behavior Immunology**, v. 22, n.3, p. 324-38, 2008.

KUVIBIDILA, S. et al. Influence of iron-deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T-cell subsets, and thymocyte proliferation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, p. 228-232, 1990.

LANDGRAF, M.A. et al. Modulation of lung allergic inflammation and malnutrition. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n.3, p. 194-206, 2008.

LANGHANS, W. Peripheral mechanism involved with catabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, n.4, p.419-26, 2002.

LESOURD, B. : Protein undernutrition as the major cause of decreased immune function in the elderly: clinical and functional implications. **Nutrition Reviews**, v.53, n. 4, p. S86-S94, 1995.

LONGSTREET, H.; KEYS, A. Adaptation to caloric restriction. **Science**, v.112, n.25, p. 215-218, 1950.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYOMI, S. et al. Induction and modulation of acute phase response by protein malnutrition in rats: comparative effects of systemic and localized inflammation on interleukin-6 in acute phase protein synthesis. **The Journal of Nutrition**, v.128, n.2, p. 166-174, 1998.

LYRA, J.S. et al. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **Journal of Pathology**, v. 171, n.3, p. 231-6, 1993.

MACKINNON, L.T. Immunity in athletes. **International Journal of Sports Medicine**, v.18, p. s62-s68, 1997.

MACKINNON, L.T. Future directions in exercise and immunology regulation and integration. **International Journal of Sports Medicine**, v.19, p. s205-s211, 1998.

MACDADE, T.W. et al. Prenatal undernutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function. **Journal of Nutrition**, v. 131, n.4, p. 1225-31, 2001.

MACNEIL, B. et al. Lymphocyte proliferation responses after exercise in men : fitness, intensity, and duration effects. **Journal of Applied Physiology**, v.70, p. 179-185, 1991.

MAHAN, M.P. & YOUNG, R. Immune parameters of untrained or exercise-trained rats after exhaustive exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.66, n.1, p. 282- 287, 1989.

MAISEL, A S.; HARRIS, T.; REARDEN, C.A . β -Adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise : Alterations in normal individuals and patients with congestive heart failure. **Circulation**, v.82, p. 2003-2010, 1990.

MALPUECH-BRUGERE, C. et al. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. **British the Journal of Nutrition**, v. 81, p. 405-411, 1999.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.54, p. s61-64, 2000.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A; Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p. s66-69, 2003.

MARTÍN, M.A. et al. Protein calorie restriction has opposite effects on glucose metabolism and insulin gene expression in fetal and adult rats endocrine pancreas. **The American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v. 286, n.4, p. E542-50, 2004.

MATARESE, G. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune system response. **European Cytokine Network**, v. 11, n.1, p. 7-14, 2000.

MCCARTER, M.D. et al. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein-calorie malnutrition. **Cellular Immunology**, v.183, p. 131-136, 1998.

MCMURRAY, D.N. Cell-mediated immunity in nutritional deficiency. **Progress in Food and Nutritional Sciences**, v.8, p. 193-228, 1984.

MITO, N. et al. Analysis of the effect of leptin on immune function in vivo using diet-induced obese mice. **Journal of Endocrinology**, v. 180, n.1, p. 167-73, 2004.

MITSUMORI, K. Et al. Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lympho-hematopoietic organs of rats treated with piperonyl butoxide or subjected to dietary restriction. **Archives in Toxicology**, v. 70, p.809-814, 1996.

MONTEIRO, C.A. Criteérios antropométricos no diagnóstico da desnutrição em programas de assistência à criança. **Revista Paulista de Saúde Pública**, v. 18, p. 209-17, 1984.

MORASKA, A. et al. Treadmill running produces both positives and negatives physiological adaptation in Sprague-dawley rats. **American Journal Physiology: Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 279, p. 1321-1329, 2000.

MORIGUCHI, S. et al. Exercise training restores decreased cellular immune functions in obese Zucker rats. **Journal of Applied Physiology**, v.84, n.1, p. 311-317, 1998.

MUSCARITOLI, M. et al. Impaired nutritional status in common variable immunodeficiencies patients correlates with reduced level of serum IgA and of circulating CD4+ T lymphocytes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 31, n.6, p. 544-9, 2001.

NEWSHOLME, E.A. et al. A role for the muscle in the immune system and its importance in surgery, trauma, sepsis and burns. **Nutrition**, v.4, n.4, p. 261-268, 1988.

NIEMAN, D.C.; BERK, L.S.; SIMPSON-WESTENBERG, M. Effects of long endurance running on immune system parameters and lymphocyte function in experienced marathoners. **International Journal of Sports Medicine**, v.10, p. 317-323, 1989.

NIEMAN, D.C.; HENSON, D.A; GUSEWITCH, G. Physical activity and immune function in elderly women. **Medicine Science in Sports and Exercise**, v.25,p. 823-831, 1993a.

NIEMAN, D.C.; MILLER, AR.; HENSON, D.A. The effect of high versus moderate intensity exercise on natural killer cell cytotoxic activity . **Medicine Sciences in Sports and Exercise**, v.25, p. 1126-1134, 1993b.

NIEMAN, D.C. Exercise effect on systemic immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 496-501, 2000.

NIIVA, T. et al. Impaired dendritic cell function resulting from undernutrition disrupts the antigen-specific immune response mice. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n.3, p. 671-5, 2007.

NOAKES, T.D. The limits of endurance exercise. **Basic Research Cardiology**, v. 101, p. 408-417, 2006.

NODERA M, YANAGISAWA H, WADA O. Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. **Life Sciences**, v. 69, p. 1639-1649, 2001.

NORTHOFF, H.; WEINSTOCK, C.; BERG, A. The cytokine response to strenuous exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v.15, p. S167-S171, 1994.

- NOVA, E. et al. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, p. S34-37, 2002.
- ORTIZ, R. et al. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocytes subpopulations of rats. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 155, p. 96-106, 2008.
- PALLARO, A.N.; ROUX, M.E.; STOBODIANICK, N.H. Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. **Nutrition**, v. 17, n.9, p. 724-728, 2001.
- PAPIENIRK, M. The thymus micro-environment and lymphocyte differentiation. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 24, n.2, p. 179-87, 1984.
- PAWELEC, G. et al. Immunosenescence : ageing of immune system. **Immunology Today**, v.16, n.9, p. 420-422, 1995.
- PEDERSEN, K.B. et al. Exercise-induced immunomodulation. possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. **International Journal of Sports Medicine**, v.18, p. S2-S7, 1997.
- PEDERSEN, K.B.; NIEMAN, D.C. Exercise immunology: integration and regulation. **Immunology Today**, v.19, n.5, p. 204-206, 1998.
- PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: Regulation, integration and adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, n.3, p. 1056-1081, 2000.
- PEDERSEN, B.K. Exercise and cytokines. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 532-535, 2000.
- PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sport Medicine**, v. 34, n.4, p. 246-51, 2000.
- PEIJIE, C. et al. Heavy load induced dysfunction of immunity and neuroendocrine response in rats. **Life Science**, v. 72, p. 2255-2262, 2003.
- PERALES, J.G. et al. Effects of exercise and food restriction in pregnant and newborn rats. Pregnancy maximum oxygen consumption. **Comparative Biochemical Physiology**, v. 102a, n. 3, p. 585-590, 1992.

PETERS, J.P.; EISEMAN, A.J.; BULGER, H.A. The plasma protein in relation to blood hydration. **Journal Clinic Investigation**, v. 1, n.5, p. 435-50, 2001.

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

PRENTICE, A. W. et al. Leptin and undernutrition. **Nutrition Reviews**, v.60, p. S56-67, 2002.

PILLAI, V.; KARANDIKAR, N. Human regulatory T cells: A unique, stable thymic subset ot a reversible peripheral state of differentiation? **Immunology Letters**, v. 114, p. 9-15, 2007.

QUADRILETERO, J.; HOFFMAN-GOETZ, L. Mouse thymocytes apoptosis and cell loss in response to exercise and antioxidant administration. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, p.436-444, 2005.

QUAGLINO, D.; RONCHETTI, I.P. Cell death in thymus: a minireview. **Apoptosis**, v. 6, n.5, p. 389-401, 2001.

REDMOND, H. P. et al. Antigen presentation in protein- energy malnutrition. **Cellular Immunology**, v.163, p. 80-87, 1995.

REDMOND, H.P. et al. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. **Archives in Surgery**, v.126, n.2, p. 192-196,1991a.

REDMOND, H.P. et al. Protein-calorie malnutrition impairs host defense against *Candida albicans*. **Journal of Surgery Research**, v.50, n.6, p. 552-559, 1991b.

REDMOND, H.P. et al. Immuno suppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. **Surgery**, v.110, n.2, p. 311-317 , 1991c.

RIGAUD, D. et al. Refeeding improves muscle performance without normalization of muscle mass and oxygen consumption in anorexia nervosa patients. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p. 1845-1851, 1997.

RODRÍGUEZ, L. et al. Assesment by flow cytometry of cytokines production in malnourished children. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.4, p. 502-507, 2005.

ROHDE, T. et al. The immune system and serum glutamine during a triathlon. **European Journal of Applied Physiology**, v.74, p. 428-434, 1996.

ROHDE, T.; KRZYWKOWSKI, K.; PEDERSEN, B.K. Glutamine, exercise and the immune system: is there a link? **Exercise Immunology Reviews**, v. 4, p. 49-63, 1998.

ROITT, I.M.; The role of autoantigens in the driving of autoimmune diseases. **Immunology Series**, v. 59, p. 119-29, 1993.

ROSS, R.; FREEMAN, J.; JANSSEN, I. Exercise alone is an effective strategy for reducing obesity and related comorbidities. **Exercise Sports Science Reviews**, v. 28, p. 165-170, 2000.

ROSS, R. et al. Exercise-induced reduction in obesity and insulin resistance in women: randomized controlled trial. **Obesity Research**, v. 12, p.789-798, 2004.

ROSENBLUM, J.; FORMAN, S.F. Management of anorexia nervosa with exercise and selective serotonergic reuptake inhibitors. **Current Opinions in Pediatrics**, v.15, p. 346-347, 2003.

RUSSELL, D.M. et al. Metabolic and structural changes in skeletal muscle during hypocaloric dieting. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.39, p. 503-513, 1984.

RUTHERFURD, W.J. Eye disease resulting from malnutrition. **British Journal Ophthalmology**, v. 5, n.2, p. 60-4, 1921.

SAUVERWEIN, R.W. et al. Inflammatory mediators in children with protein-energy malnutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p. 1534-1539, 1997.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. **Neuroendocrine control of thymus physiology**. Endocrine Review, v. 21, p. 412-443, 2000.

SAVINO, W. et al. Intrathymic T cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? **Trends in immunology**, v. 23, p. 305-313, 2002.

SAVINO, W. et al. Control of thymocyte migration: an interplay of distinct cellular interactions. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, p. 951-961, 2004.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. **European journal of Clinical Nutrition**, v.56, p. s46-49, 2002.

SAVINO, W. et al. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, p. 951-961, 2004.

SAVINO, W. The thymus as a common target organ in infection diseases. **Plos Pathogens**, v. 2, n.6, p. 472-483, 2006.

SAVINO, W. et al. The thymus as a common target organ in malnutrition and infection . **British Journal of Nutrition**, p. s11-s16, 2007. Supp 1.

SCHAIBLE, U.E.; KAUFMANN, S.H. malnutrition and infection: complex mechanism and global impact. **Plos Medicine**, v. 4, n.5, p. e115, 2007.

SEELAENDER, M.C.L. **Metabolismo de lípidos em ratos portadores de tumor Walker 256: avaliação da atividade do sistema carnitina palmitoil transferase**. Tese (Doutorado) - Instituto de Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 1994.

SHEPARD, R.J. Exercise in the prevention and treatment of cancer, an up-date. **Sports Medicine**, v. 15, p. 258-280, 1993.

SHEPHARD, R.J.; SHEK, P.N. Potential impact of physical activity and sport on the immune system – a brief review. **British Journal of Sports Medicine**, v. 28, n.4, p. 247-255, 1994.

SOARES, M.J.; SHETTY, P.S. Basal metabolic rates and metabolic efficiency in chronic undernutrition. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 45, p. 363-373, 1991.

SPURR, G.B.; BARAC-NIETO, M.; REINA, J.C.; ROMELIA RAMIREZ, M.S. Marginal malnutrition in school-aged Colombian boys: efficiency of treadmill walking in submaximal exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 39, p. 452-459, 1984.

SPURR, G.B.; REINA, J.C.; BARAC-NIETO, M. Marginal malnutrition in school-aged Colombian boys: anthropometry and maturation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 37, p. 119-132, 1983.

SPURR, G.B.; REINA, J.C.; DAHNERS, H.W.; BARAC-NIETO, M. Marginal malnutrition in school-aged Colombian boys: functional consequences in maximum exercise. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 37, p. 834-847, 1983.

SHETTY, P. Adaptation in low energy intake: the response and limits to low intake infants, children and adults. **European Journal Clinical Nutrition**, v.53, p. s14-33, 1999. Suppl. 1.

SMITH, E.M. Opioids peptides in immune cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 521, p. 51-68, 2003.

SOTO-MOYANO, R. et al. Early malnutrition and changes in the induced release of noraadrenaline in the prefrontal cortex of adult rats. **International Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 3-4, p. 93-102, 1987.

SPRENGER, H. et al. Enhanced release of cytokines interleukin-2 receptors, and neopterin after long distance running. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.63, p. 188-194, 1992.

STITES, W.E.; MEEKER, A.K.; SHORTLE, D. Evidence for strained interaction between side-chain and the polypeptide backbone. **Journal of Molecular Biology**, v. 235, n. 1, p.27-32, 1994.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n.10, p. 6093-6, 1997.

TAUB, D.D.; LONG, D.L. Insights into thymic aging and regeneration. **Immunology Reviews**, v. 205, p. 72-93, 2005.

TAYLOR, H.L.; KEYS, A. Adaptation to caloric restriction. **Science**, v. 112, p. 215-218, 1950.

TORUN, B.; VITERI, F.E. Influence of exercise on linear growth. **European Journal Clinical Nutrition**, v. 48, p. S186-9, 1994. Suppl. 1.

TRUE, R.H. Toxicity and malnutrition. **Science**, v. 6, n.42, p. 195-196, 1915.

VAN TITS, L.J.; MICHEL, M.C.; GROSSE-WILDE, H. Catecholamines increase lymphocyte beta 2- adrenergic receptors via a beta 2- adrenergic, spleen-dependent process. **American Journal of Physiology**, v.258, p. e 191-202, 1990.

VASQUEZ-GABIRAY, E. et al. Nutritional support with nucleotide addition favours immune response in severely malnourished infants. **Archives of Medical Research**, v. 35, p. 284-288, 2004.

VILLA-VERDE, D.M.S. et al. Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. **Endocrinology**, v.133, p. 867-875, 1993.

VIRTS, E.L.; PHILIPPS, J.A.; THOMAN, M.A. A novel approach to thymic rejuvenation in the aged. **Rejuvenation research**, v.9, n. 1, p. 134-42, 2006.

WALRAND, S. et al. Specific and nonspecific immune response to fasting and refeeding differ in healthy young adults and elderly persons. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 74, n.5, p. 670-8, 2001.

WAN, Y.Y. the role for cytokines generation and maintenance of regulatory T cells. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 114-130, 2006.

WATERLOW, J.C. Childhood malnutrition in developing nations: looking back and looking forward. **Annual Reviews Nutrition**, v. 14, p. 1-19, 1987.

WAITZBERG, D.L.; CAIAFFA, W.T.; CORREIA, M.I. Hospital malnutrition: the brazilian national survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n.7-8, p. 573-80, 2001.

WATTS, T., Thymus weights in malnourished children. **Journal of Tropical Pediatrics**, v.15, p.155, 1969.

WHEATLAND, R. Alternative treatment considerations in anorexia nervosa. **Medical Hypotheses**, v.59, p. 710-715, 2002.

WOODS, J.A. et al. Exercise and cellular innate immune function. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n.1, p. 57-66, 1999.

WOODS, J.A. et al. Exercise training increased the naive to memory T cell ratio in old mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.17, p. 384-392, 2003.

WOODS, J.A.; VIEIRA, V.J.; KEYLOK, K.T. Exercise , inflammation and innate immunity. **Neurologic Clinic**, v. 24, n.3, p. 585-599, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Conquering suffering, enriching humanity. **The World Report**, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . A safer future: Global Health Public security in 21st century. **The World Report**, 2007.

YE, P.; KIRSCHNER, D.E. Measuring Emigration of human thymocytes by T-cell receptor excision circles. **Critical Reviews in Immunology**, v. 22, n.5 e 6, p. 483-497, 2000.

Yeh, C.L. et al. Dietary glutamine supplementation modulates Th1/Th2 cytokines and interleukin-6 expression in septic mice. **Cytokine**, v. 31, p. 329-334, 2005.

YOUNG, V.R; SCRIMSHAW, N.S. Physiology of starvation. **Scientific American**, v. 225, n.4, p.14-21, 1971.

ZAMAN, K. et al. Association between nutritional status , cell-mediated immune status and acute lower respiratory infections in Bangladeshi children. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.50, p. 309-314, 1996.

ZHANG, S.; PETRO, T.M. The effect of moderate protein malnutrition on murine T cell cytokine production. **Nutrition Research**, v.17, n.1, p. 51-64, 1997.

ZHANG, X.; HILLYER, L.M.; WOODWARD, B.D. The capacity noninflammatory(steady-state) dendritic cells to present antigen in the primary response is preserved in acutely protein – or energy-deficient weaning mice. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p.2748-2756, 2002.

ZHANG, N. et al. The role apoptosis in the development and function of T lymphocytes. **Cell Research**, v.15, n.10, p. 749-769, 2005.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

ORIGINAL ARTICLE

Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation

W. D. S. CUNHA,* G. FRIEDLER,* M. VAISBERG,† M. I. EGAMI,‡ L. F. B. P. COSTA ROSA*

*Laboratory of Metabolism, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil, †Discipline of Immunology, São Paulo Federal University Medical School, UNIFESP, Brazil, and ‡Department of Morphology, São Paulo Federal University Medical School, UNIFESP, Brazil (Correspondence to: LFBPCR, Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas I, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1524, sala 302, 05508-900, Butantan, São Paulo, Brasil)

Abstract—Objective: The aim of our study is to determine the effect of a 30-day-period caloric restriction (CR) upon the immune response of rats and the influence of glutamine upon mononuclear cells proliferation and cytokine production.

Methods: Male albino Wistar rats were submitted to CR receiving an amount of food equivalent to 50% of the mean amount consumed by the control animals. We measured the incorporation of [2-¹⁴C]-thymidine by lymphocytes obtained from the spleen and mesenteric lymph nodes, plasma glucose and glutamine concentration, as well as cytokine production by cultivated cells, in the presence of glutamine.

Results: Rats submitted to CR presented reduced body weight (49%) and decreased splenic leukocyte number. CR led to a reduction in the proliferative response of lymphocyte. Spleenocytes from CR animals produced less γ -interferon and interleukins 1, 4 and 10 in 48 h culture than did those from control rats. The same pattern is observed in cells obtained from the mesenteric lymph nodes. The addition of glutamine 2 mM to the culture medium restored spleen and mesenteric lymph node cells' proliferative response and the production of interleukin 2 by cells obtained from the spleen and from the mesenteric lymph nodes.

Conclusions: The present data reinforce that undernutrition decreases in vitro immune cell function and indicates that, in such circumstances, glutamine supplementation could reverse some of the changes observed in the functionality of cultured immune cells. The presence of the amino acid at physiological concentration, however, reinforces the diversion of the immune response towards a Th₁-like response.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Key words: malnourishment; glutamine; cytokines; caloric restriction; glutamine synthetase; lymphocytes

Introduction

Undernutrition is still a noticeable cause of impaired immunocompetence, and has been shown to be an important causal factor in the increased susceptibility to infectious diseases in normal and hospitalized patients (1, 2). Rapidly proliferating tissues are very sensitive to changes in nutrient availability and hormonal status. For this reason, it may be expected that subtle changes in the immune system, which presents a rapid turnover of cells and enormous protein synthesis, may be observed in malnourished animals (3).

Undernutrition depresses both cell-mediated and humoral immunity, resulting in thymus, spleen and lymph node atrophy (4–6), significantly impairs macrophage activation (7), decreases the absolute number of T cells (8), decreases thymic hormone production (9) and delayed-type hypersensitivity (10, 11), and impairs development of cytotoxic T cells (12). The changes observed, however, depend on the severity and time of exposure to caloric restriction (CR) (5, 13, 14), as well as on the type of dietary protein consumed (15–17).

The lack of appropriate food intake is a decisive factor in predisposing to infections and death (15, 18, 19), as happens frequently to low-income individuals. In such cases, changes in the immune system, as that observed in thymus, could be considered as part of a process of closing-down functions which can be best sacrificed in the short term to ensure long-term survival (15). Calorie restriction, on the other hand, appears to preserve immune function in autoimmune-susceptible mice (20, 21) and to delay cellular events involved in the ageing process, prolonging the life span of small animals (20–22). There is, however, relatively little amount of research directed toward the effects of dietary restriction in young animals. The aim of our study is, therefore, to determine the effect of a 30-day-period CR restriction upon the immune response of rats and the influence of glutamine upon mononuclear cells proliferation and cytokine production.

Materials and methods

Animals

Male albino Wistar rats ($n=10$) weighing 150 g were obtained from the Institute of Biomedical Sciences,

University of São Paulo. The rats were kept at 23°C and a light/dark cycle of 12/12 h, lights on at 7:00 am.

Chemicals and enzymes

All chemicals and enzymes were obtained from Boehringer Mannheim, GmbH, Lewes, East Sussex, UK, Sigma-Aldrich, WI, USA, and Life Technologies, SP, Brazil.

Caloric restriction protocol

The animals were housed individually and weighed two times a week, during 1 month. The group submitted to CR received the amount of food equivalent to 50% of the mean amount consumed by the control animals. After 30 days of CR, the animals presented reduced body weight (Fig. 1). The protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research from the Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo.

Incorporation of [2-¹⁴C]-thymidine by lymphocytes obtained from the spleen and mesenteric lymph nodes (MLNs)

After spleen and MLNs disruption in an inox mesh, as previously described (23), cell suspensions were centrifuged at 500 g for 15 min, 37°C, and cell viability determined by using Trypan blue exclusion test. The cells were cultured in RPMI-1640 medium without glutamine, with 10% homologous serum, for 24 h at 37°C in an artificially humidified atmosphere of 5% CO₂ in air, under sterile conditions. The cells were cultured in a LAB-LINE Microprocessor CO₂ incubator (LAB LINE, USA) in 96-well plates (Corning, NY, USA), at a density of 2×10^5 cells/well (total volume, 200 µl), stimulated with concanavalina A, 20 µg/well. After 24 h

in culture, more than 98% of mononuclear cells were still viable, as measured by Trypan blue exclusion test. To address the possible effect of glutamine upon cell proliferation, the cells were cultured in the presence of exogenous glutamine (0.75 mM, CR + G) or alanine (0.75 mM, CR + Al), while those from the CR group were cultured in an RPMI medium with 0.45 mM glutamine, as these are plasma glutamine concentration described for control and CR groups, respectively (Table 3).

The cells were then pulsed with 20 µl (0.02 µCi) [2-¹⁴C]-thymidine (sp. Act. 56.0 mCi nM⁻¹) diluted in sterile PBS. Cells were then maintained under these conditions for an additional 16 h and harvested automatically by a multiple cell harvester onto a filter paper (cat n° 11731 Skatron Combi, Suffolk, UK). The paper discs containing the labelled cells were added to vials containing 5 ml of Ecolume (ICN, CA, USA scintillation cocktail), and counted in a Beckman-LS 5000TD liquid scintillation counter (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Plasma metabolite measurements

Plasma glucose concentration was determined as previously described by Trinder (24) and plasma glutamine concentration was determined using the method described by Windmueller and Spaeth (25).

Determination of cytokine production

Mononuclear cells obtained from the spleen and MLNs ($\pm 79\%$ lymphocytes) were plated (1.0×10^6 cells/ml) in plastic petri dishes in RPMI 1640 medium enriched with glutamine 2 mM and 10% homologous serum, in the presence of phytohemagglutinin (PHA) (10 µg/ml) to stimulate interleukins 1, 4 and 10 (IL-2, IL-4, IL-10), γ -interferon (INF γ) and tumour necrosis factor- α (TNF α) production or lipopolysaccharide (LPS) (10 µg/ml) to stimulate IL-1 α production. After 48 h, the concentration of the cytokines was measured in the supernatant using commercially available ELISA-kits (Amersham-Life Science, R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

A semi-quantitative RT-PCR method was used for the estimation of the concentration of glutamine synthetase mRNA. The red portion of the gastrocnemius muscle (100 mg) was homogenized according to Chomczynski and Sacchi (26). RNA concentration was determined spectrophotometrically (Beckman DU 640, Fullerton, CA, USA). A 33 µl pre-mix containing 3 µg RNA, 10 U of placental RNase inhibitor, 2 µl oligo(dt), 2 µl dNTP (10 nmol), 2 µl DTT, 10 U of Moloney-murine leukaemia virus reverse transcriptase, and 4 µl $10 \times$ reaction

Fig. 1 Body weight gain (g) in control and undernourished rats. The results represent the mean of 10 rats $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ for comparison with the caloric restriction group; CR—rats submitted to caloric restriction.

buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 150 mM MgCl₂ in nuclease free water) was used to reverse transcribe RNA into cDNA. The RT-mixture was incubated at 80°C for 3 min, followed by 21°C for 10 min, 42°C for 30 min and then 99°C for 10 min. Two microlitres of the product obtained was subjected to 1% agarose and ethidium bromide electrophoresis. The sequences of glutamine synthetase primers were derived from published sequences (27) and that for RPL19 used as internal control. Each 3 µl PCR mixture contained 40 ng cDNA, 0.5 U AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA), 2.5 nmol each dNTP, and 10 µM of glutamine synthetase primers in reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂). The reaction proceeded at 94°C, 28 cycles of 1 min, for denaturation, annealing at 60°C for 35 s and extension at 72°C for 1 min. Five microlitres of the PCR mixture was then subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (agarose 1.2% and ethidium bromide) and the semi-quantitative analysis was performed with a Typhoon (Molecular Dynamics) and the program Image QuANT TM (4, 27).

Statistical analysis

The data obtained were compared using ANOVA and the post-hoc test of Tukey and the level of significance of at least $P < 0.05$ was chosen for all statistical comparisons. The data are presented as mean $\pm$ SEM.

Results

To verify whether the CR imposed on the animals led to undernutrition, body weight and splenic leukocyte number were determined. Rats submitted to CR presented reduced body weight (49%, Fig. 1) and decreased splenic leukocyte number (58% fewer cells, data not shown).

The influence of CR upon the immune system was addressed by evaluating MLNs and spleen lymphocytes

proliferation and their ability to produce cytokines after 48 h in culture. CR led to a reduction in the proliferative response of lymphocytes from the MLNs and in those from the spleen (52% and 61%, respectively, Table 1). Undernutrition also provoked a marked reduction in the response of such cells to concanavalin A, a mitogen for T cell, 49% and a 21% decrease in the proliferative response of cells from the MLN and spleen, respectively (Table 1), was observed.

Spleenocytes from CR animals produced less INF γ and IL-1, IL-4 and IL-10 in 48 h culture (reduction of 49%, 43%, 45% and 40.5%, respectively, Table 2) than did those from control rats. The same pattern is observed in cells obtained from the MLNs which showed a reduction of 57.8%, 39%, 29% and 33.2% in INF γ and IL-1, IL-4 and IL-10 production, respectively (Table 2). Cells obtained from the spleen of CR rats showed, however, increased production of IL-2 (19%, Table 2).

The animals submitted to CR presented, also, reduced plasma glutamine concentration (36.3%) but increased concentration of glutamine synthetase mRNA, as measured by a semi-quantitative RT-PCR (Table 3).

The addition of glutamine 0.75 mM to the culture medium restored spleen and MLN cells proliferative response as shown in Table 1, as well as the production of INF γ and IL-1 (Table 2). The presence of glutamine in concentrations similar to those found for the control group, in the culture medium also increased the production of IL-2, 23.7% and 17.9% by cells obtained from the spleen and from the MLNs, respectively (Table 2), and that of TNF, 14% and 29% (Table 2). The addition of alanine, however, did not change the proliferative response, nor cytokine production by cells obtained from the MLNs or spleen (Tables 1 and 2). In fact, these experiments with the addition of alanine to the culture medium were made with another set of undernourished rats, in which we found the same pattern of changes observed previously, and it is important to clarify if the results obtained with glutamine supplementation were specific or not.

Table 1 Proliferative response of lymphocytes obtained from the MLN (LFN) and spleenocytes (spleen) of control and undernourished rats (CR) in the presence or not of glutamine (CR + G) or alanine (CR + Al) in the culture medium

	No addition	SEM	ConA	SEM
Spleen C	2598	156.7	7684.6	429.6
Spleen CR	989.6*	81.7	2292F*	167.9
Spleen CR + G	2250.3†	187.6	7139.6†	332.8
Spleen CR + Al	1067.4*	98.5	2673.4*	223.6
LFN C	10859	673.8	18509	1072.3
LFN CR	5182.7*	342.1	4444.3*	766.4
LFN CR + G	8737.4*†	549.6	17099†	983.7
LFN CR + Al	5401.5*	287.5	4608.5*	659.7

* $P < 0.05$ for comparison with the values obtained for cells obtained from the control animals.

† $P < 0.05$ for comparison with the values obtained for cells obtained from CR group.

C—control group, CR—cells from rats submitted to caloric restriction; CR + G—cells from rats submitted to caloric restriction cultivated in the presence of glutamine, CR + Al—cells from rats submitted to caloric restriction cultivated in the presence of alanine.

The results are presented as decay per minute, as mean $\pm$ SEM of 10 animals.

Table 2 Cytokine production by lymphocytes obtained from the MLNs (LFN) and spleen after 48 h of culture in the presence or not of glutamine or alanine added to the medium

Cytokines	Spleen C		Spleen CR		Spleen CR + G		Spleen CR + Al	
TNF	1879.5	47.8	1762.1	65.1	2139.6	78	1851.5	102
INF	32.4	1.3	16.5*	0.8	30.9	1.1	15.1*	1.1
IL-1	769.5	32.1	438.5*	45.8	771.3	67.4	397.5*	35.7
IL-2	1473.8	85.3	1759.2*	70.4	1823.5*	65.1	1902.2*	81.4
IL-4	370.6	21.7	201.4*	26.7	223.7*	23	196.5*	31
IL-10	128.5	9.7	76.4*	6.9	81.6*	5.9	74.3*	4.7
Cytokines	LFN C		LFN CR		LFN CR + G		LFN CR + Al	
TNF	1528.4	142.4	1662.9	89.4	1972.8	99.2	1712.8	86.4
INF	27.5	1.1	11.6*	0.3	29.4	1.2	12.6*	0.9
IL-1	659.3	33.8	399.4*	38.5	602.6	29.4	351.2*	32.7
IL-2	1903.6	98.4	2128.4	76.9	2245.7*	88.6	2103.6	102.7
IL-4	427.4	31.4	301.3*	19.5	276.4*	29.6	286.5*	17.6
IL-10	165.3	10.5	110.4*	10.9	128.4*	8.6	102.7*	14.1

* $P < 0.05$ for comparison with the values obtained from the control (C) group.

C—control group, CR—cells from rats submitted to caloric restriction; CR + G—cells from rats submitted to caloric restriction cultivated in the presence of glutamine, CR + Al—cells from rats submitted to caloric restriction cultivated in the presence of alanine.

The results are expressed as pg/ml and represent the mean $\pm$ SEM of 10 animals.**Table 3** Plasma glucose (mg/dL) and glutamine (mM) concentration and that of glutamine synthetase (GS) mRNA in soleus muscle of control and undernourished rats (CR)

	Control	SEM	CR	SEM
Glucose	117.4*	8.7*	115.2	6.3
Glutamine	721.7*	56.8*	459.2*	38.5
GS-mRNA	1.61*	0.34*	6.85*	1.14

* $P < 0.05$ for comparison with the values obtained from the control group.

CR—cells from rats submitted to caloric restriction.

The results represents the mean $\pm$ SEM of 10 animals.

Discussion

As previously described, undernutrition leads to immunosuppression (4, 14, 28), associated with a reduced body weight gain. CR also led to thymus atrophy, with important changes in thymus structure, as observed in our animals (data not shown) indicating a severe loss of thymus function, since the differences between the cortical and medullar zone of the lobules was lost (6). Despite the changes observed in the thymus, a moderate increase in splenic T cells responsiveness to polyclonal mitogens stimulated by increased IL-2 production by cells from undernourished rats has been reported (4). In our animals, we also observed an increased production of IL-2 after CR, but not only by cells from the spleen, but also by cultured cells obtained from the MLNs (LFN). These results, however, are not a consensus (3). Our data demonstrated, as well, that the production of TNF was not altered by CR, while that of INF, IL-1, IL-4 and IL-10 was reduced, indicating that CR modifies specific aspects of the immune response, leading to a diversion towards a Th₁-like response, with a decreased production of specific antibodies and mucosal IgA levels (29).

These changes in cytokine production by cultured mononuclear cells from the spleen and MLNs were

accompanied by a reduction in the proliferative response of such cells to concanavalin A, a mitogen for T-cell. Considering that IL-2 is a very important cytokine in stimulating T-cell proliferation and that its production is increased in CR rats, we can hypothesize an impairment in the function of antigen presenting cells as previously described by Zhang and Petro (4).

To better address the mechanism involved in the effects of CR upon the immune response of the animals we determined plasma glutamine concentration, since glutamine is an essential amino acid for the immune cells, including lymphocytes and antigen presenting cells such as B-lymphocytes and macrophages (23, 30).

In fact, a 24 h fast induced an increase in plasma glutamine concentration (27), abolished by an additional stressful stimulus and, as demonstrated by our data, after a chronic CR regime. Considering that glutamine is a non-essential amino acid, produced in large scale by the skeletal muscles, we evaluated glutamine synthetase expression in such muscles. It is interesting to note, however, that the expression of glutamine synthetase mRNA is increased in the skeletal muscle of undernourished rats. The increase in glutamine synthetase activity and expression could be related to the reduced plasma glutamine concentration, as previously demonstrated by Labow and colleagues (31), who showed a 3.5-fold increase in glutamine synthetase activity in skeletal muscle after glutamine starvation. The increase in enzyme expression, however, was not matched by an increase in plasma glutamine concentration, probably due to an increased demand of glutamine from cells such as immune cells and enterocytes, and possibly by other organs, in excess of the individual's capability for its synthesis (32). In this way, it is possible that during such starvation regime glutamine would be utilized as a neoglycogenic substrate in liver, helping in keeping glycaemia in normal values. In such circumstances, an increase in enzyme expression

would be taken as an adaptative response to hypoglutaminemia during starvation, open the possibility that glutamine supplementation to the culture medium of cells obtained from CR rats reversed part of the changes in the immune response first observed.

The addition of glutamine, mimicking physiological concentrations, recovered partially the changes observed in cytokine production by cells obtained from the spleen and the MLNs of undernourished rats, except that of IL-4 and IL-10, indicating a more pronounced diversion towards a Th₁-like response. It is interesting to mention, however, that glutamine addition to the culture medium restored the proliferative response of mononuclear cells to concanavalin-A, suggesting that the antigen presenting cells recovered their ability to stimulate cell proliferation in the presence of adequate plasma glutamine concentration. It is interesting to note that alanine added to the culture medium, instead of glutamine, did not change any of the parameters studied. The set of experiments with alanine supplementation was performed in a second group of undernourished rats, that presents however, the same pattern of changes in lymphocytes proliferation as those observed in the first experiment.

The present data reinforce that undernutrition decreases *in vitro* immune cell function and indicate that, in such circumstances, glutamine supplementation could reverse some of the changes observed in the functionality of cultured immune cells. The presence of the amino acid at physiological concentration, however, reinforces the diversion of the immune response towards a Th₁-like response.

References

- Huang Y. Malnutrition in the critically ill. *Nutrition* 2001; 17: 754–746
- Waitzberg D L, Caiaffa W T, Correia M I. Hospital malnutrition: the Brazilian National Survey (IBRANUTRI): a study of 4000 patients. *Nutrition* 2001; 17: 573–580
- Chandra R K, Sarchielli P. Bodysize immune responses. *Nutr Res* 1996; 16: 1813–1819
- Zhang S, Petro T M. The effect of moderate protein malnutrition on murine T cell cytokine production. *Nutr Res* 1997; 17: 51–64
- Chandra S, Chandra R K. Nutrition, immune response and outcome. *Food Nutr Sci* 1986; 10: 1–65
- Bell R G, Hazel L A, Price P. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. *Clin Exp Immunol* 1976; 26: 314–326
- Reinolds J V, Redmond H P, Ueno N, Steigman C, Ziegler M N, Daly J M, Johnston Jr R B. Impairment of macrophage activation, granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cell Immunol* 1992; 139: 493–504
- Chandra R K. The nutrition–immunity–infection nexus: the enumeration and functional assessment of lymphocyte subsets in nutritional deficiency. *Nutr Res* 1983; 3: 605–615
- Chandra R K. Serum thymic hormone activity in protein energy malnutrition. *Clin Exp Immunol* 1979; 38: 228–230
- Kielmann A A, Ueberoi I V, Chandra R K, Vehra V L. The nutritional status on immune capacity, immune response in preschool children in a rural community in India. *Bull WHO* 1976; 54: 477–483
- Neumann G G, Lawlor Jr, G J, Steihm E R. Immunologic responses in malnourished children. *Am J Clin Nutr* 1975; 28: 89–104
- Liberman M D, Reynolds J, Goldfine J, Shou J, Daly J M. Protein-calorie malnutrition inhibits antitumor response to interleukin 2 immunotherapy. *Surgery* 1990; 108: 452–459
- Petro T M, Smith B G, Raybourne R. Restoration of immunoregulation in splenic lymphocyte populations of mice fed reduced dietary protein. *Nutr Res* 1986; 6: 1293–1305
- Petro T M. Reduced dietary protein levels decrease interleukin 3 production of murine splenic T lymphocytes. *Nutr Res* 1989; 9: 1259–1268
- Pallaro A S, Roux M E, Slobodianik N H. Nutrition disorders, immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. *Nutrition* 2001; 17: 724–728
- Bounous G, Kongshavn P. Differential effect of dietary type on the B cell, T cell immune responses in mice. *J Nutr* 1985; 115: 1403–1409
- Parker N, Goodram K. A comparison of casein, lactalbumin and soy protein. Effect of the immune response to a T dependent antigen. *Nutr Res* 1990; 10: 781–784
- Ameng M A. Protein quality of weaning baby food from African white sweet-potato varieties, *Apios americano* with pigeon peas added as a complementary protein. *Nutr Res* 1994; 14: 1397–1402
- Huffman S, Martin L. First feeding: optimal feeding of infants and toddlers. *Nutr Res* 1994; 14: 127–131
- Christadoss P, Talal N, Lindstrom J, Fernandes G. Suppression of cellular, humoral immunity to T-dependent antigens by calorie restriction. *Cell Immunol* 1984; 88: 1–7
- Stapleton P P, Fujita J, Murphy E M, Naam H A, Daly J M. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition* 2001; 17: 41–45
- Fernandes G, Yunis E J, Good R A. Influence of diet on survival of mice. *Proc Nat Acad* 1976; 73: 1279–1285
- Curi R, Newsholme E A. The effect of a denine nucleotides on the rate of glutamine utilization by incubated mitochondria isolated from rat mesenteric lymph nodes. *Mol Cell Biochem* 1989; 86: 71–76
- Trinder R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Am Clin Biochem* 1969; 6: 24–27
- Windmuller H G, Spaeth A E. Uptake metabolism of plasma glutamine by small intestine. *J Biol Chem* 1974; 249: 5070–5079
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–159
- Kong S, Hall J C, Cooper D, McCauley R D. Starvation alters the activity, and mRNA level of glutamine and glutamine synthetase in the rat intestine. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 393–400
- Chandra R K. Cell-mediated immunity in nutritional imbalance. *Fed Proc* 1980; 39: 3088–3092
- McGee D W, McMurray D N. Protein malnutrition reduces the IgA immune response to oral antigen by altering B-cell, and suppressor T cell functions. *Immunol* 1988; 64: 697–702
- Newsholme P, Newsholme E A. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end products by mouse peritoneal macrophages in culture. *Biochem J* 1989; 261: 211–218
- Labow B I, Souba W W, Abcouwer S F. Mechanism governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism—glutaminase glutamine synthetase. *J Nutr* 2001; 131: 2467S–2474S
- Boza J J, Turini M, Moënnoz D et al. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats. *Nutrition* 2001; 17: 35–40

Submission date: 25 June 2002 Accepted: 3 March 2003

Exercise Restores Immune Cell Function in Energy-Restricted Rats

WILTON DARLEANS DOS SANTOS CUNHA¹, MARCUS VINÍCIUS GIAMPIETRO¹, DANIEL FERNANDES DE SOUZA¹, MAURO VAISBERG³, MARÍLIA CERQUEIRA LEITE SEELAENDER², and LUÍS FERNANDO BICUDO PEREIRA COSTA ROSA¹

¹Laboratory of Metabolism and ²Laboratory of Histophysiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo, BRAZIL; and ³Discipline of Immunology, São Paulo Federal University Medical School, UNIFESP, BRAZIL

ABSTRACT

DOS SANTOS CUNHA, W. D., M. V. GIAMPIETRO, D. F. DE SOUZA, M. VAISBERG, M. C. L. SEELAENDER, and L. F. B. P. COSTA ROSA. Exercise Restores Immune Cell Function in Energy-Restricted Rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 36, No. 12, pp. 000–000, 2004. Objectives: To evaluate the effect of chronic moderate-intensity exercise upon the alterations of immune system cell function induced by energy restriction. Methods: Forty male Wistar rats were randomly assigned to the following groups: sedentary animals fed *ad libitum* (SF, $N = 10$) or submitted to energy restriction (SER, $N = 10$, receiving 50% of the mean amount of chow consumed by SF); and trained animals fed *ad libitum* (TF, $N = 10$) or submitted to energy restriction (TER, $N = 10$), who exercised on a treadmill (at 60–65% $\dot{V}O_{2max}$) 5 d·wk⁻¹ for 10 wk, after 30 d under the restriction protocol. The incorporation of [²⁻¹⁴C]-thymidine by lymphocytes obtained from the spleen and mesenteric lymph nodes, plasma glucose and glutamine concentration, and cytokine production by cells cultivated in the presence of glutamine were measured in all groups, 24 h after the last exercise session. Two-way ANOVA and Tukey's posttest were employed for the statistical analysis. Results: Training induced an increase in the proliferative response and in the production of γ -interferon and interleukin-1 ($P < 0.05$) in cells from the spleen and lymph nodes of SER, in which these parameters were diminished when compared with SF ($P < 0.05$). SER spleen and lymph node cells produced more TNF (26 and 42%, respectively) and IL-2 (49 and 42%, respectively) than SF. The Th₁-like diversion of the immune response observed in SER persisted after training. Partial recovery of the decreased SER plasma glutamine concentration and muscle glutamine synthase mRNA was observed. Conclusions: Training induced the recovery of the proliferative capacity of lymphocytes from SER, probably due to the partial restoration of plasma glutamine levels, but did not interfere with the diversion towards a Th₁-type immune response induced by food restriction. Key Words: TRAINING, MALNOURISHMENT, CYTOKINES, ENERGY RESTRICTION, GLUTAMINE SYNTHASE, LYMPHOCYTES

Exercise modulates both the innate and the acquired branches of the immune system. The direction and magnitude of the changes, however, are influenced by numerous factors (such as the type, duration, and intensity of exercise), as well as the conditioning level and age of the subject (4). Because of the number of factors influencing the immune system during exercise, a multitude of findings, from immunodepression to immunostimulation, has been reported.

During exercise, there is recruitment of natural killer cells (NK) and B and T lymphocytes to the blood, leading to an increased total lymphocyte count (4). After a prolonged and intense bout of exercise, however, the number of NK and

lymphocytes in peripheral blood is reduced, as is the function of NK and B lymphocytes (4). The response of lymphocytes to mitogens after exercise is still subject to controversy, because both decreases and increases in this parameter are reported in the literature (23). Despite different findings across studies, it is clear that exercise modifies the cellular and humoral branches of the immune system, and that regular physical activity at light to moderate levels can increase the host's resistance to disease, whereas heavy exertion enhances the risk of illness (23). The mechanism by which endurance exercise induces changes in leukocyte function and number is complex and includes immune and neuroendocrine signals, with an augmented release of various hormones, peptides, and cytokines (23,29), and changes in plasma glutamine levels (21).

The fact that moderate regular activity contributes to improved immune response has led the medical community to adopt it as a complementary therapeutic strategy for the management of various conditions, including cancer cachexia and AIDS (1,12). Undernourishment is still a noticeable cause of impaired immunocompetence, and has been shown to be an important causal factor in the increased susceptibility to infection in normal subjects and hospitalized patients (14). Indeed, the lack of appropriate food intake is a decisive factor in predisposing to infectious

Address for correspondence: Luis F. B. P. Costa Rosa, Dept. of Histology and Embryology, Institute of Biomedical Sciences I, University of São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1524, Room 302, 05508-900, Butantan, São Paulo, Brazil; E-mail: ggrosa@icb.usp.br.
Submitted for publication January 2004.
Accepted for publication July 2004.

0195-9131/04/3612-0001
MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®
Copyright © 2004 by the American College of Sports Medicine
DOI: 10.1249/01.MSS.0000147626.32295.38

1

<ARTICLE DOCTOPIC="BASIC SCIENCES" DOCSUBJ="Original Investigations" DATE="December 2004" VID="36" ISS="12" PPF="000" PPL="000"
DOI="10.1249/01.MSS.0000147626.32295.38">

The recovery of the Skatron cell harvester was 95%, as informed by the manufacturer.

For determination of cytokine production, mononuclear cells obtained from the spleen and from the mesenteric lymph nodes ($\pm 79\%$ lymphocytes) were plated (1.0×10^6 cells mL^{-1}) onto plastic Petri dishes with RPMI 1624 medium enriched with 2 mM glutamine and 10% homologous serum, in the presence of $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ phytohemagglutinin to stimulate IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ , and TNF α production, or lipopolysaccharide (LPS) ($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), to stimulate IL-1 α production. After 48 h, the concentration of the cytokines was measured in the supernatant with commercially available ELISA-kits (Quantikine $^{\text{®}}$ Elisa Kits, R&D Systems, Abingdon, UK). All kits showed lower than 10% precision and reproducibility variation for both within-assay and between-assay measurements, a recovery of 95%, and no cross reaction with other cytokines, as informed by the manufacturer.

Plasma metabolite measurements. Plasma glucose concentration was determined as previously described by Trinder (28), plasma glutamine concentration was determined using the method described by Windmueller and Spaeth (30) and corticosterone concentration was determined by the fluorometric method of Guillemain and colleagues (13).

Analysis of muscle glutamine synthase mRNA expression. A semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction method was used for the estimation of the concentration of glutamine synthase mRNA. The red portion of the gastrocnemius muscle (100 mg) was homogenized according to Chomczynski and Sacchi (8) in Trizol $^{\text{®}}$. Total RNA concentration was determined spectrophotometrically (Beckman DU 640, Fullerton, CA). A 33- μL assay mix containing 3- μg RNA, 10 units of placental RNase inhibitor, 2- μL oligo (dt), 2- μL dNTP (10nmol), 2- μL DTT, 10 units of Moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Co., Scotland, UK), and 4- μL 10 $\times$ reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 150 mM MgCl $_2$ in nuclease free water) was used to produce cDNA. The RT mixture was incubated at 80 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min, then at 21 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min, at 42 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min, and at 99 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Two microliters of the product obtained were fractionated in 1% agarose and ethidium bromide gel to assess the quality of the reaction. The samples used for PCR were those for which a similar amount of product was obtained after rtPCR. The glutamine synthase primers were designed after the published Genebank sequences (ATCT-TGCATCGGGTATGCGA) (15). RPL19 gene was used as the internal control. Each 3- μL PCR mixture contained 40-ng cDNA, 0.5 units AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Foster City, CA), 2.5 nmol each dNTP, and 1.0 μM of glutamine synthase primers in reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl $_2$). Standard curves for sample dilution and cycle number were obtained to ensure that no saturation was occurring in the assay. The chosen PCR reaction (28 cycles) consisted of 1 min at 94 $^{\circ}\text{C}$, 35 s at 60 $^{\circ}\text{C}$, and 1 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. Five microliters of the PCR mixture were fractionated in poly-

FIGURE 1—Body weight gain (g) in control (SF) and energy-restricted rats (SER). The results represent the mean $\pm$ SEM of 10 rats per group; * $P < 0.05$ for comparison with the energy-restricted (SER) group.

acrylamide gel (agarose 1.2% and ethidium bromide 1%). Semiquantitative analysis was performed after image capture with the Typhoon $^{\text{®}}$ (Molecular Dynamics), with the ImageQuant $^{\text{TM}}$ software (16).

Statistical analysis. Variance homogeneity was assessed, and data transformation was employed when necessary. The data obtained were compared using ANOVA with two factors, level of physical activity (sedentary or trained), and food regimen (*ad libitum* or energy restriction), followed by the *post hoc* test of Tukey. The level of significance of at least $P < 0.05$ was chosen for all statistical comparisons. The data are presented as mean $\pm$ SEM.

RESULTS

Characterization of the state of undernourishment. Rats submitted to energy restriction showed reduced body weight (49%, Fig. 1) in comparison with controls. These animals also presented noticeable changes in thymus structure under light microscopy (not shown), with remarkable atrophy, as the parenchyma was partially replaced by fatty and fibrous tissue. Energy restriction also induced loss of cortex/medulla differentiation in the organ.

The influence of energy restriction upon the immune system was addressed by evaluating the proliferative capacity of lymphocytes obtained from the mesenteric lymph

TABLE 1. Proliferative response of lymphocytes obtained from the mesenteric lymph nodes (LFN) and splenocytes (spleen) of sedentary rats fed *ad libitum* (SF), energy restricted rats (SER), and trained rats fed *ad libitum* (TF) or submitted to energy restriction (TER); the results are expressed as disintegration per minute, mean $\pm$ SEM of 10 animals per group.

	No Addition	SEM	ConA	SEM
Spleen SF	2432	132.7	8102.4	324.8
Spleen SER	974.1*	76.7	3261*	204.9
Spleen TF	2657	107.5	9840*	217.1
Spleen TER	2380.3†	165.6	7476.6†	366.8
LFN SF	9823	650	18,532	996
LFN SER	5066.7*	612	4103*	492
LFN TF	10,240	431.2	23,487*	569
LFN TER	8877.4†	741	16,672†	1087

* $P < 0.05$ for comparison with the values obtained with cells from SF; † $P < 0.05$ for comparison with the values obtained with cells from SER group.

TABLE 2. Cytokine production by lymphocytes obtained from the mesenteric lymph nodes (LFN) and from the spleen of sedentary rats who were fed *ad libitum* (SF), sedentary rats submitted to energy restriction (SER), and trained rats fed *ad libitum* (TF) or under energy restriction (TER), after 48 h of culture; the results (pg·ml⁻¹) represent the mean $\pm$ SEM of 10 animals per group.

Cytokines	Spleen SF	Spleen SER	Spleen TER	Spleen TF	LFN SF	LFN SER	LFN TER	LFN TF								
TNF	1764.2	51.9	1688.4	44.1	2234.8*	61	1271.3*	30.4	1455.3	105.3	1506.4	71.6	1542.1	65.4	1033.2*	67.3
INF	37.4	1.0	15.4*	1.1	40.5	3.2	22.8*	0.9	58.7	2.6	17.4*	1.4	49.5†	4.1	58.3	3.1
IL-1	796.4	42	406.8*	39.7	801.7	54	544.8*	57	807.8	30.5	231.7*	28.6	639.0	25.2	414.3*	29.4
IL-2	1473.8	85.3	1759.2*	70.4	2123.5*†	65.1	2011.8*	142.8	2015.4	76.4	2271.3	113.7	2671.9*†	65.4	3054.3*	178.4
IL-4	392.1	34.7	190.5*	36.1	202.5*	16.7	287.4*	22.1	406.4	17.8	253.8*	14.5	288.4*	39.8	311.4*	31.8
IL-10	184.3	12.8	65.3*	3.9	72.8*	4.3	104.3*	21.3	202.5	12.3	103.2*	11.5	117.5*†	7.5	84.3*	14.6

* $P < 0.05$ for comparison with the values for the cells obtained from SF; † $P < 0.05$ for comparison with the values for cells obtained from the SER group.

nodes and the spleen, as well as the ability of these cells to produce cytokines after 48 h in culture. Energy restriction induced a reduction in the proliferative response of lymphocytes from both sources (48 and 59%, for lymph node and spleen cells, respectively (Table 1)). This protocol also provoked a marked reduction in the mitogenic response of these cells to concanavalin A (decreasing 77 and 59% for LFN and spleen lymphocytes, respectively (Table 1)) as compared with control cells.

Splenocytes from SER animals produced less γ -interferon and interleukins 1, 4, and 10 after 48 h in culture (decreasing 58, 49, 51, and 64%, respectively (Table 2)) in comparison with C. The same pattern was observed in LFN: reduction of 69, 61, 37, and 48% in γ -interferon and interleukins 1, 4, and 10 production, respectively (Table 2). The cells obtained from the spleen of SER, however, showed increased interleukin-2 production (19%, (Table 2)) in relation to SF.

The animals submitted to energy restriction showed reduced plasma glutamine concentration (44%), but increased concentration of glutamine synthase mRNA (3.7-fold), compared with SF (Table 3).

Effect of training. The moderate-intensity training protocol imposed upon the animals submitted to energy restriction restored spleen and mesenteric lymph node cells proliferative response, as shown in Table 1, as well as the production of γ -interferon and interleukin 1 (Table 2). Cells obtained from the spleen of TER produced 26% more TNF and 44% more IL-2 than those from SER (Table 2), but less IL-4 (49%) and IL-10 (60%). Similarly, the cells from the mesenteric lymph nodes from TER produced more IL-2 (42%) and less IL-4 (39%) and IL-10 (41%) than those obtained from SER. Interestingly, skeletal muscle from SER presented an increased expression of glutamine synthase mRNA, concomitant with a reduction in plasma glutamine concentration.

DISCUSSION

It is well known that undernutrition leads to immunosuppression (31). We have, therefore, sought to examine the effects of moderate-intensity exercise training upon some of the parameters of immune cell metabolism and function that are modified in response to energy restriction. Energy restriction is also acknowledged to induce thymus atrophy, with important changes in thymus structure and severe loss of function, as the differences between the cortical and medullar zone of the lobules are lost (2). Despite the changes observed in the thymus, a moderate increase in splenic T cells' responsiveness to polyclonal mitogens inducing IL-2 production has been previously reported (31). We also observed increased production of IL-2 after energy restriction, not only by cells from the spleen, but also by cultured cells obtained from the mesenteric lymph nodes (LFN - 9). These results, however, are not a consensus, as many other groups did not find changes in cytokine production in undernourished animals (7). Our data also demonstrated that the production of tumor necrosis factor was not altered by energy restriction, whereas that of INF, IL-1, IL-4, and IL-10 was reduced, indicating that this protocol modified specific aspects of the immune response. In fact, cytokines, which are signaling molecules of the immune system, play an important role in controlling its homeostasis, and may be divided into proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- α) and T-helper type 1 (Th₁) cytokines, such as IL-2 and IFN- γ , or still, T helper type 2 (Th₂) cytokines, IL-4, IL-10 (27). The balance of cytokines modulates the profile (cellular or humoral) and intensity of the response (27). Therefore, the changes in the profile of cytokine production observed in our model lead to a diversion toward a Th₁-like response, with a decreased production of specific antibodies and mucosal IgA levels (18).

The changes in cytokine production by cultured mononuclear cells from the spleen and mesenteric lymph nodes

TABLE 3. Plasma glucose (mg·dl⁻¹) and glutamine (mM) and corticosterone concentration and expression of glutamine synthase (GS) mRNA (gene/RPL19) in the soleus muscle of sedentary rats fed *ad libitum* (SF), sedentary rats submitted to energy restriction (SER) and trained rats fed *ad libitum* (TF), or under energy restriction (TER); the results represent the mean $\pm$ SEM of 10 animals per group.

	SF	SEM	SER	SEM	TER	SEM	TF	SEM
Glucose	122.6	6.5	113.7	8.9	115.9	7.5	118.7	8.4
Glutamine	783.9	33.1	439.8*	33.8	672.1*†	21.9	892.1*	27.6
Corticosterone	197.5	23.4	317.4*	42.1	181.3†	21.2	202.7	37.9
GS-mRNA	1.54	0.27	5.78*	1.21	3.16*†	0.6	1.96*	0.33

* $P < 0.05$ for comparison with the values obtained for cells from SF animals; † $P < 0.05$ for comparison with the values obtained for cells from SER group.

were accompanied by a reduction in the proliferative response to concanavalin A, a mitogen for T-cells. Considering that IL-2 is a very important cytokine for the stimulation of T-cell proliferation, and that its production is increased in SER, the decrease observed in cell proliferation should be related to an impairment in the function of antigen-presenting cells, as previously described by Zhang and Petro (31) in a model of protein malnutrition.

Glutamine is an essential amino acid for immune cells, including lymphocytes and antigen-presenting cells such as B-lymphocytes and macrophages (10). We chose to investigate the effect of energy restriction upon the concentration of this amino acid in the plasma. It has been previously reported (15) that there is an increase of plasma glutamine concentration in rats fasted for 48 h (15), paralleled by a reduction in intestinal glutaminase activity and an increase in liver net output of the amino acid (15). This change in plasma glutamine concentration is fully abolished by a chronic caloric restriction regimen (9). It is interesting to note, however, that the expression of glutamine synthase mRNA was increased in the skeletal muscle of energy-restricted rats. The enhancement in glutamine synthase activity and expression could be related to the lower plasma glutamine concentration, as previously demonstrated by Labow and colleagues (16), who showed a 3.5-fold increase in the activity of this enzyme in skeletal muscle after glutamine starvation. The increase in enzyme expression was not matched by changes in plasma glutamine concentration, probably because of an increased demand for glutamine by immune cells and possibly enterocytes, as well as by the liver and kidney, which may use this amino acid for gluconeogenesis (3). Therefore, we can speculate that there is an increased demand (similar to what occurs during glucocorticoid treatment (3)) during energy restriction for glutamine, which is greater than the individual's maximal synthesis capacity, leading to a reduction in plasma concentration (3).

The moderate-intensity training protocol adopted herein restored the proliferative activity of cells obtained from the spleen and mesenteric lymph nodes, as well as their ability to respond to concanavalin A. It is interesting to note, however, that training, although able to induce the recovery of cell proliferative capacity, did not increase that response in comparison with that observed for cells obtained from

control animals. In fact, the effect of exercise upon leukocyte proliferation is known to vary according to the type, duration, and intensity of the exercise, as described by Fry and colleagues (11) and demonstrated by other research groups (23).

The moderate exercise training protocol was not able to reverse the energy-restriction-induced diversion of the immune response towards a Th₁ type, as it provoked an increase in IL-2 production and a decrease in IL-4 and IL-10 synthesis by cultured cells.

The training program induced a partial recovery of plasma glutamine concentration. Cunha and colleagues (9) demonstrated that the addition of glutamine to the culture medium of lymphocytes obtained from undernourished rats (who present decreased plasma concentration of the amino acid) restored their ability to produce cytokines and to proliferate in response to concanavalin A. Therefore, we can speculate that the partial recovery of plasma glutamine concentration induced by training could at least partly explain the recovery of immune function observed in our study.

The alterations in glutamine flux, on the other hand, could be related to changes in plasma corticosterone concentration and glutamine synthase activity, as both glutamine and glucocorticoids decrease glutamine synthase mRNA expression in the skeletal muscle (3).

Concluding remarks. Although previous work by our group and others has shown disruption of splenocyte function caused by energy restriction, this is the first study, to our knowledge, to address and characterize the effect of undernutrition on lymphocytes obtained from the lymph nodes. Chronic endurance exercise was able to reestablish immune cell (both splenocytes and lymph node cells) function in energy-restricted rats, an effect that could be, at least partially, associated with the observed increase in plasma glutamine levels induced by training. The diversion towards a Th₁-type response caused by energy restriction was not affected by training.

Taken together, our results demonstrate that the moderate-intensity exercise training program was able to partially revert the changes in immune cell function observed in rats submitted to energy restriction, while reinforcing a diversion of the immune response toward a Th₁-type response.

REFERENCES

1. ARDRE, C. M. Exercise, cachexia, and cancer therapy: a molecular rationale. *Nutr. Cancer* 42:143-157, 2002.
2. BELL, R. G., L. A. HAZEL, and P. PRICE. Influence of dietary protein restriction on immune competence. II. Effect on lymphoid tissue. *Clin. Exp. Immunol.* 26:314-326, 1976.
3. BOZA, J. J., M. TURINI, D. MOISEWICZ, et al. Effect of glutamine supplementation of the diet on tissue protein synthesis rate of glucocorticoid-treated rats. *Nutrition* 17:35-40, 2001.
4. BRULINSGAARD, H., A. HARTKOPF, T. MOHR, et al. *In vivo* cell-mediated immunity and vaccination response following prolonged, intense exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29:1176-1181, 1997.
5. CHANDRA, R. K. Serum thymic hormone activity in protein energy malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.* 38:228-230, 1979.
6. CHANDRA, R. K. The nutrition-immunity-infection nexus: the enumeration and functional assessment of lymphocyte subsets in nutritional deficiency. *Nutr. Res.* 3:605-615, 1983.
7. CHANDRA, R. K., and P. SARCHIELLO. Nutritional status and immune responses. *Clin. Lab. Med.* 13:455-461, 1993.
8. CHOMCZYNSKI, P., and N. SACCHI. Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1987.
9. CUNHA, W. D. S., G. FRIEDLER, M. VAISBERG, M. I. EGAMI, and L. F. B. P. COSTA ROSA. Immunosuppression in under nourished rats: the effect of glutamine supplementation. *Clin. Nutr.* 22:453-457, 2003.
10. CURR, R., and E. A. NEWSHOLME. The effect of adenine nucleotides on the rate and fate of glutamine utilization by incubated mito-

- chondria isolated from rat mesenteric lymph nodes. *Mol. Cell Biochem.* 86:71-76, 1989.
11. FREY, R. W., A. R. MORTON, G. P. M. CRAWFORD, and D. KEAST. Cell numbers and *in vitro* responses of leukocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur. J. Appl. Physiol.* 64:218-227, 1992.
 12. GRISPOON, S., and K. MULLIGAN. Weight loss and wasting in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 36:S69-S78, 2003.
 13. GUILLEMIN, R., W. G. CLAYTON, J. D. SMITH, and H. S. LIPSCOMB. Measurement of free corticosteroids in rat plasma, physiological validation of a method. *Endocrinology* 63:349-357, 1958.
 14. HUANG, Y. Malnutrition in the critically ill. *Nutrition* 17:754-746, 2001.
 15. KONO, S., J. C. HALL, D. COOPER, and R. D. McCALLEY. Starvation alters the activity and mRNA level of glutamine and glutamine synthase in the rat intestine. *J. Nutr. Biochem.* 11:393-400, 2000.
 16. LABOW, B. I., W. W. SOUBA, and S. F. ARCOVER. Mechanism governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism: glutaminase and glutamine synthase. *J. Nutr.* 131:2467S-2474S, 2001.
 17. LIBERMAN, M. D., J. REYNOLDS, J. GOLDFINE, J. SHOU, and J. M. DALY. Protein-calorie malnutrition inhibits antitumor response to interleukin 2 immunotherapy. *Surgery* 108:452-459, 1990.
 18. McGEZ, D. W., and D. N. McMURRAY. Protein malnutrition reduces the IgA immune response to oral antigen by altering B-cell and suppressor T cell functions. *Immunology* 64:697-702, 1988.
 19. MENEZUELLO, M. O., J. R. MENDONÇA, A. H. LANCHI, JR., and L. F. B. P. COSTA ROSA. Effect of arginine, ornithine and citulline supplementation upon performance and metabolism of trained rats. *Cell Biochem. Funct.* 21:85-91, 2003.
 20. NEUMANN, G. G., G. J. LAWLER, JR., and E. R. STEPH. Immunologic responses in malnourished children. *Am. J. Clin. Nutr.* 28: 89-104, 1975.
 21. NEWSHOLME, E. A. Biochemical mechanisms to explain immunosuppression in well-trained and overtrained athletes. *Int. J. Sports Med.* 15:S142-S147, 1994.
 22. NEWSHOLME, P., L. F. B. P. COSTA ROSA, E. A. NEWSHOLME, and R. CURT. The importance of fuel metabolism to macrophage function. *Cell Biochem. Funct.* 14:1-10, 1996.
 23. NIEMAN, D. C., D. A. HENSON, R. JOHNSON, L. LEBECK, J. M. DAVIS, and S. L. NEHLEN-CANDARELLA. Effect of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulation and proliferative response. *Med. Sci. Sports Med.* 24:1339-1345, 1992.
 24. PALLARO, A. S., M. E. ROUX, and N. H. SLOBOZIANEK. Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. *Nutrition* 17:724-728, 2001.
 25. PARKER, N., and K. GOODRAM. A comparison of casein, lactalbumin and soy protein: effect of the immune response to a T dependent antigen. *Nutr. Res.* 10:781-784, 1990.
 26. REDFOLDS, J. V., H. P. REDMOND, N. UENO, et al. Impairment of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cell Immunol.* 139:493-504, 1992.
 27. SPRENT, J., and C. D. SURH. Cytokines and T cell homeostasis. *Immunol. Lett.* 85:145-149, 2003.
 28. TRISLER, R. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Am. Clin. Biochem.* 6:24-27, 1969.
 29. WEICKER, H., and E. WIRL. Interaction between hormones and the immune system. *Int. J. Sports Med.* 12:S30-S37, 1991.
 30. WINDMILLER, H. G., and A. E. SPAETH. Uptake and metabolism of plasma glutamine by small intestine. *J. Biol. Chem.* 249:5070-5079, 1974.
 31. ZHANG, S., and T. M. PETRO. The effect of moderate protein malnutrition on murine T cell cytokine production. *Nutr. Res.* 17:51-64, 1997.