

Helena Angélica Pereira Batatinha

Efeitos da suplementação de probióticos na modulação das células do sistema imunológico e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutorado em Ciências

São Paulo

2021

Helena Angélica Pereira Batatinha

Efeitos da suplementação de probióticos na modulação das células dos sistema imunológico e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutorado em Ciências

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão Original

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Batatinha, Helena Angélica Pereira
Efeitos da suplementação de probióticos na
modulação das células dos sistema imunológico e por
consequência nas infecções do trato respiratório
superior em corredores de longa distância / Helena
Angélica Pereira Batatinha; orientador José Cesar
Rosa Neto. -- São Paulo, 2021.
115 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sistema imunológico. 2. Exercício físico de
longa duração. 3. Linfócitos T . 4. Probióticos. I.
Rosa Neto, José Cesar, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Helena Angélica Pereira Batatinha

Título da Dissertação/Tese: Efeitos da suplementação de probióticos na modulação das células do sistema imunológico e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância.

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

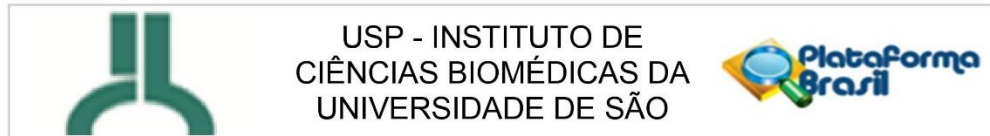
Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROBIÓTICOS NA MODULAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL E POR CONSEQUÊNCIA NAS INFECÇÕES DO TRATO RESPIRATÓRIO SUPERIOR EM CORREDORES DE LONGA DISTÂNCIA.

Pesquisador: Jose Cesar Rosa Neto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 61892116.9.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.930.380

Apresentação do Projeto:

O projeto está bem apresentado.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo está bem definido.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e os benefícios são significativos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem elaborado, com objetivos claros, bem estruturado em todos os aspectos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais pendências ou inadequações a serem apontadas.

Endereço: Av. Pro^{fa} Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

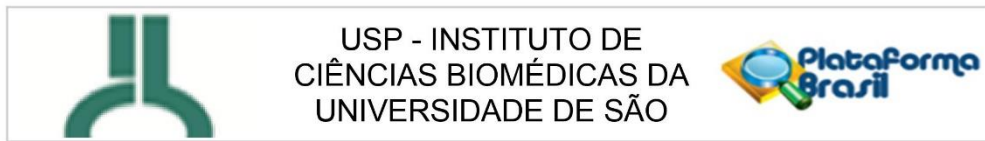
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

Fax: (11)3091-8405

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 1.930.380

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

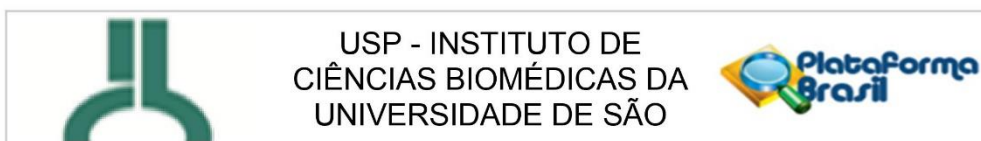
Em não havendo um biorrepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante site do ICB.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_747758.pdf	30/01/2017 12:58:16		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_S.pdf	30/01/2017 12:57:36	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pdf.pdf	30/01/2017 12:56:15	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	10/08/2016 15:33:03	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Folha de Rosto	folha.pdf	10/08/2016 15:31:22	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	10/08/2016 15:30:17	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biodepositorio.pdf	10/08/2016 15:29:42	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso.pdf	10/08/2016 15:29:32	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura003.pdf	10/08/2016 15:27:19	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito
Cronograma	cronograma005.pdf	10/08/2016 15:27:05	Jose Cesar Rosa Neto	Aceito

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 1.930.380

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Fevereiro de 2017

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Regina Scivoletto', is written over a horizontal line.

Assinado por:
Regina Scivoletto
(Coordenador)

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br

Aos meus pais,

Ao meu irmão

A meus amigos

A todos que me ajudaram, de alguma maneira,
neste processo

Agradecimentos

À minha mãe e ao meu pai, Matilde e Ricardo, por todo amor, toda dedicação, por cada palavra de incentivo, pelo apoio incondicional, por serem meus modelos e minha guia

Ao meu irmão, Júlio, pelo amor e por ser meu melhor parceiro

A todos meus amigos, pela amizade verdadeira e pelos momentos memoráveis

Ao meu Orientador, Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto (Zeca), por acreditar no meu potencial, pela paciência e dedicação durante todos esses anos, e por sempre me incentivar a buscar o meu melhor

Aos professores Drs Fabio Santos Lira, Ronaldo Vagner Thomatieli dos Santos e Antonio Herbert Lancha Jr pelo suporte durante todo processo

Aos meus colegas de projeto Geovana Leite e Edgar Tavares por formarem a melhor equipe de coleta de dados e me ajudarem em todo o processo

Aos colegas de laboratório por todo auxílio durante esses anos

Ao meu orientador do estágio no exterior, Richard Simpson, e aos meus colegas de laboratório Grace Niemi, Forrest Baker, Kyle Smith, Tiffany Zuniga e Douglass Diak; por me acolherem tão bem e por proporcionarem meu crescimento como cientista e ser humano.

Ao departamento de Biologia de sistemas pelo apoio estrutural

A FAPESP, pelo apoio financeiro no doutorado, processo número: 2016/10561-8 e no BEPE, processo número: 2019/09520-3

A todos meus familiares, muito obrigada!

RESUMO

Batatinha HAP. Efeitos da suplementação de probióticos na modulação das células do sistema imunológico e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2021

A suplementação com probióticos apresenta uma importante capacidade imunomoduladora e surge como uma importante estratégia para tratar doenças autoimunes, doenças crônicas, entre outras. Exercícios prolongados de alta intensidade são conhecidos por diminuir a função das células imunológicas, diminuindo o desempenho do atleta e prejudicando sua recuperação. Nossa hipótese foi de que 30 dias consecutivos de suplementação com probióticos, antes de uma prova de maratona, seria capaz de modular as células do sistema imunológico e diminuir a incidência de infecções oportunistas. 27 maratonistas do sexo masculino foram randomizados de maneira duplo-cega em dois grupos, probiótico e placebo. Os atletas do grupo probiótico receberam 30 sachês contendo *Bifidobacterium-animalis-subsp.-Lactis* (10×10^9) e *Lactobacillus-Acidophilus* (10×10^9) + 5 gramas de maltodextrina; os do grupo placebo receberam 30 sachês do mesmo peso, cor e sabor, contendo 5 gramas de maltodextrina; eles consumiram 1 sachê por dia até o dia da maratona. Foi coletado sangue antes do início da suplementação (basal), um dia antes da corrida (pré), uma hora após a corrida (pós) e 5 dias após a corrida (recuperação). O grupo suplementado com probiótico manteve a população total de linfócitos T CD8+ após a prova, bem como as subpopulações de memória efetora. O probiótico também foi capaz de modular a resposta dos linfócitos ao estímulo. O treinamento e a maratona foram capazes de modular uma subpopulação de linfócitos T duplo negativo ($CD3^+CD4^-CD8^-$) independente da suplementação. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos em relação à incidência e severidade dos sintomas associados a infecções do trato respiratório superior.

Palavras chave: Sistema imunológico, Probióticos, Maratona, linfócitos T, células duplo-negativas

ABSTRACT

Batatinha HAP. The effects of probiotic supplementation on the immune cells and on upper respiratory tract infection in endurance runners [PhD's Thesis (Cellular and tissue Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020

Probiotic supplementation arises as playing an immune-stimulatory role. High-intensity and -volume exercise can inhibit immune cell function, which threatens athletic performance and recovery. We hypothesized that 30 days of probiotic supplementation could stabilize the immune system of athletes preventing immune suppression after a marathon race. Twenty-seven male marathonists were double-blinded randomly into probiotic (*Bifidobacterium-animalis-subsp.-Lactis* (10×10^9) and *Lactobacillus-Acidophilus* (10×10^9) + 5 grams of maltodextrin) and placebo (5 grams of maltodextrin) group. They received 30 sachets and supplemented 1 portion/day during 30 days before the race. Blood was collected 30 days before (rest), 1 day before (pre), 1 hour after (post) and 5 days after the race (recovery). Both chronic and acute exercise modulated a different T lymphocyte population (CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T-cells), increasing pre-race, decreasing post, and returning to rest values at the recovery. The total number of CD8 T cell and the memory subsets statistically decreased only in the placebo group post-race. Pro-inflammatory cytokine production by stimulated lymphocytes decreased in the probiotic group after the supplementation period. 30 days of probiotic supplementation maintained CD8 T cell and effector memory cell population and played an immunomodulatory role in stimulated lymphocytes. Both, training, and marathon modulated a non-classical lymphocyte population regardless of probiotic supplementation.

Keywords: T cells, Immune System, Exercise, Marathon, URTI, Gamma-delta T cells, MAIT cells.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica.....	40
Tabela 2- Dados descritivos da amostra.....	42
Tabela 3 - Recordatório de treino.....	43
Tabela 4 - Dados descritivos das provas de maratona realizadas nos anos de 2017 e 2018.....	43
Tabela 5 - Dados referentes ao consumo alimentar dos atletas 30 dias (basal) e 1 dia antes da prova (pré).....	44
Tabela 6 - Dados referentes ao consumo alimentar dos atletas durante a prova de maratona.....	45
Tabela 7 – Serie vermelha no sangue dos atletas nos diferentes momentos.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação e diferenciação dos Leucócitos.....	21
Figura 2. Comportamento dos linfócitos antes, durante e após um evento esportivo prolongado de alta intensidade.....	27
Figura 3: Ilustração do Desenho experimental.....	38
Figura 4. Estratégia de gating para os linfócitos T analisados por citometria de fluxo.....	41
Figura 5. Produção das citocinas no sangue total dos atletas do grupo placebo.....	48
Figura 6. Produção das citocinas no sangue total dos atletas do grupo probiótico.....	49
Figura 7. Contagem da série branca.....	51
Figura 8. População de linfócitos.....	52
Figura 9. Linfócitos duplo-negativos:.....	53
Figura 10. Expressão gênica dos fatores de transcrição.....	54
Figura 11. Valor absoluto dos subtipos de memória dos linfócitos T CD8.....	55
Figura 12. Valor absoluto dos subtipos de memória dos linfócitos T CD4.....	56
Figura 13. IFN γ produzido por linfócitos estimulados.....	57
Figura 14. TNF α produzido por linfócitos estimulados.....	58
Figura 15. IL-1 β produzido por linfócitos estimulados.....	59
Figura 16. IL-6 produzido por linfócitos estimulados.....	60
Figura 17. IL-10 produzido por linfócitos estimulados.....	61
Figura 18. IL-2 produzido por linfócitos estimulados.....	62
Figura 19. IL-4 produzido por linfócitos estimulados.....	63
Figura 20. IL-15 produzido por linfócitos estimulados.....	64
Figura 21. IL-8 produzido por linfócitos estimulados.....	65
Figura 22. Expressão gênica dos mediadores inflamatórios.....	66
Figura 23. ITRS.....	67

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1.	Sistema imunológico e exercício.....	18
2.2.	O efeito do exercícios sob a mobilização, função e apoptose dos linfócitos	22
2.3.	Linfócitos, substratos energéticos e suplementação nutricional esportiva.....	26
2.4.	Probióticos, sistema imunológico e exercício	29
3.	OBJETIVO.....	32
3.1.	Objetivos específicos da proposta.....	32
4.	JUSTIFICATIVA	33
5.	MÉTODOS	34
5.1.	Procedimentos Éticos	34
5.2.	Amostra.....	34
5.2.1.	Critérios de Inclusão	34
5.2.2.	Critérios de Exclusão	35
5.3.	Protocolo experimental	35
5.4.	Composição corporal	36
5.5.	Coleta de Sangue.....	37
5.6.	Sangue total estimulado.....	37
5.7.	Análises Bioquímicas.....	38
5.8.	Cultura de células e isolamento dos linfócitos	38
5.9.	Imunofenotipagem de sangue total	38
5.10.	Extração de RNA e PCR real-time.....	39
5.11.	Questionários	40
5.11.1.	Questionário de Consumo e Frequência alimentar.....	40
5.11.2.	Questionário de Infecções do Trato Respiratório Superior (QITRS).....	40
5.11.3.	Recordatório de treinos	40
5.12.	Análise estatística.....	41
6.	RESULTADOS	42
6.1.	Caracterização da amostra.....	42
6.2.	Produção de citocinas no sangue total estimulado.....	45
6.3.	Contagem completa das células do sangue dos atletas	47

6.4.	População de linfócitos T	49
6.5.	Linfócitos T duplo-negativos	51
6.6.	Subpopulação de memória dos linfócitos T	52
6.7.	Produção de citocinas pelos linfócitos sob estímulo.....	54
6.8.	Expressão gênica dos marcadores inflamatórios.....	64
6.9.	Infecção do trato respiratório superior.....	64
7.	DISCUSSÃO	66
8.	CONCLUSÃO.....	73
9.	REFERÊNCIAS.....	74
	APÊNDICES.....	84
	Apêndice A – Publicação referente aos dados do doutorado.....	84
	Apêndice B – Modelo do Termo de consentimento Livre e esclarecido.....	98
	ANEXOS	102
	Anexo A – Publicações, como primeira autora, realizadas durante o doutorado (2016-2021).....	102
	Anexo B – Publicações, como colaboradora, realizadas durante o doutorado (2016-2021)	107

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas pesquisas associam o sedentarismo como um forte preditor para o desenvolvimento de doenças (GONZÁLEZ; FUENTES; MÁRQUEZ, 2017); por outro lado, a prática regular de exercício física se mostra eficiente tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças (SIMPSON et al., 2009; STEFANI; GALANTI, 2017). Diversas pesquisas comprovam os efeitos anti-inflamatórios da prática regular de exercício físico (GIELEN et al., 2003; PETERSEN; PEDERSEN, 2005), sendo este, um aliado importante para o tratamento e prevenção de doenças inflamatório-crônicas. Entretanto, sessões de exercício físico extenuantes, sem uma recuperação adequada podem levar a um quadro de imunossupressão.

A queda na resposta imunológica, atrelada ao exercício, tem sido bastante observada em atletas de endurance (GABRIEL et al., 1998; GUNZER; KONRAD; PAIL, 2012). Durante muitos anos foi associado que o exercício extenuante, per si, induzia um quadro de imunossupressão transitória. Estudos mostraram que a capacidade dos macrófagos em apresentar antígenos estava alterada após uma prova de maratona, prejudicando resposta imunológica contra patógenos, e aumentando a susceptibilidade a infecções virais (Hong S, Mills PJ. 2008, Simpson RJ, McFarlin B 2009). O número e a função dos neutrófilos circulantes e das células T e NK, também foram reduzidas em resposta a maratona; bem como menor concentração de imunoglobulina A (IgA) salivar (NIEMAN, 2007). Além disso, o exercício exaustivo prolongado eleva a concentração de cortisol no soro. A concentração elevada de cortisol inibe a proliferação de linfócitos e diminuem a função dos monócitos (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Ademais, a concentração plasmática de glicose e glutamina, após uma maratona, é reduzida (CARVALHO-PEIXOTO; ALVES; CAMERON, 2007); esses dois substratos energéticos são os principais meios de obtenção de energia para linfócitos e macrófagos (BATATINHA et al., 2019). Levando todos esses aspectos em consideração, desenvolveu-se a hipótese de que uma sessão de exercício físico exaustivo com duração prolongada, como uma maratona, poderia aumentar a incidência de infecções do trato respiratório (ITRS) superior em atletas (NIEMAN, 2007).

Estudos mais recentes têm apontado que a condição física em que o atleta chega para a prova alvo é muito mais determinante para a imunossupressão

transitória, do que o evento agudo (SIMPSON et al., 2020). Isto é, aqueles atletas que já chegam em um estrado de overtraining (fadiga crônica) por uma carga excessiva de treino, por falta de descanso adequado e planejamento nutricional inapropriado possuem chances mais elevadas de desenvolver infecções oportunistas (GHOLAMNEZHAD et al., 2014; HACKNEY; KOLTUN, 2012; SCHWELLNUS et al., 2016).

Portanto, estratégias que fortaleçam o sistema imunológico desses indivíduos, não só no momento da prova, mas também durante os treinamentos, podem ser cruciais para prevenir a imunossupressão transitória e o aparecimento de infecções oportunistas.

Na última década pesquisas sobre a microbiota e seu papel junto ao sistema imunológico se intensificaram e trouxeram resultados promissores. A microbiota intestinal estimula o sistema imunológico e o sensibiliza para responder de maneira adequada aos antígenos, diminuindo alergias e melhorando a resposta contra infecções. Os SCFAs (*do inglês - Short Chain FattyAcids*), metabólitos gerados pelas bactérias, provindos principalmente do metabolismo de fibras, ativam as células dendríticas e macrófagos imaturos, e estimulam a produção de IgA pelos linfócitos B (BERMON et al., 2015; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Também regulam a expressão dos TLRs (toll-like receptors), desencadeando uma reação em cascata, o que ativa a via do NF-kB assim como as células T, aumentando a produção de citocinas (LI et al., 2018). Fortalecer então esse micro ecossistema é uma estratégia interessante para reduzir ou tratar doenças imunológicas e imunometabólicas.

Uma vertente que ganha força, para modular a microbiota a fim de fortalecer o sistema imunológico e prevenir doenças, é a suplementação de probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que interagem de maneira simbiótica com nosso organismo. Eles diminuem a disponibilidade de nutrientes para bactérias patogênicas, prevenindo a colonização destas na superfície da mucosa, além de produzirem substâncias antimicrobianas com elevada capacidade antibiótica (KELLY; CONWAY; AMINOV, 2005). O consumo de leite enriquecido com *Bifidobacterium lactis* HN019 5×10^9 ou 5×10^{10} UFC aumenta o número de células T CD4, T CD8 e neutrófilos (COX et al., 2010).

Pensando nesses dados, a suplementação com probióticos pode ser uma ferramenta interessante para fortalecer o sistema imunológico dos atletas reduzindo assim a imunossupressão transitória. Um estudo com ciclistas revelou que a

suplementação de *Lactobacillus fermentum* 1×10^9 por 11 semanas reduziu a incidência de ITRS em homens, assim como a seriedade dos sintomas quando apresentados (WEST et al., 2012).

Tendo em vista esses estudos nossa hipótese foi que 30 dias de suplementação com probióticos seria capaz de fortalecer o sistema imunológico dos atletas amadores evitando uma imunossupressão transitória e o aparecimento de ITRS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema imunológico e exercício

O Sistema imunológico é composto por células (leucócitos) e moléculas que tem como função proteger o organismo contra patógenos, prevenir o desenvolvimento de doenças e infecções, erradicar infecções já existentes, eliminar células malformadas e iniciar o reparo tecidual (ABBAS; LINCHTMAN; PILLAI, 2012). Esse sistema é didaticamente dividido em inato e adaptativo, entretanto, ambos atuam de maneira conjunta e coordenada o que garante uma resposta imunológica eficiente.

É chamada de imunidade inata a primeira linha de defesa do organismo, ela recebe esse nome por não apresentar uma resposta específica contra patógenos e por estar presente desde os primeiros minutos de vida. Os principais leucócitos que compõe esse sistema são os neutrófilos, monócitos e macrófagos, células dendríticas e as células natural killers (NK)(Figura 1) (ABBAS; LINCHTMAN; PILLAI, 2012).

Os neutrófilos atuam principalmente contra infecções bacterianas (LEHRER et al., 1988), as células dendríticas são responsáveis pela apresentação de antígenos (MACRI et al., 2018), os monócitos se infiltram nos tecidos e se diferenciam em macrófagos, estes então possuem uma ação fagocítica, reguladora e de apresentação de antígenos (HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019). As células natural killer atuam principalmente no combate a células cancerígenas e contra infecções virais (MORVAN; LANIER, 2016).

Já a imunidade adaptativa recebe esse nome pois ela se adapta aos diferentes estímulos e desenvolve uma resposta específica contra os microrganismos invasores, além disso, essa imunidade é responsável pela formação da memória imunológica. Os linfócitos B e T são as células que compõe essa imunidade (Figura 1) (ABBAS;

LINCHTMAN; PILLAI, 2012). Eles são ativados a partir da apresentação de antígenos, onde se diferenciam e se proliferam respondendo ao estímulo. Os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos e produzem anticorpos específicos para cada antígeno (ABBAS; LINCHTMAN; PILLAI, 2012). Já os linfócitos T possuem duas subpopulações os Linfócitos T auxiliares (ou T *helper* do inglês), também conhecidos como CD4; que produzem citocinas; e os Linfócitos T citotóxicos, também conhecidos como CD8, que possuem uma ação citotóxica inativando células infectadas por contato direto (ABBAS; LINCHTMAN; PILLAI, 2012).

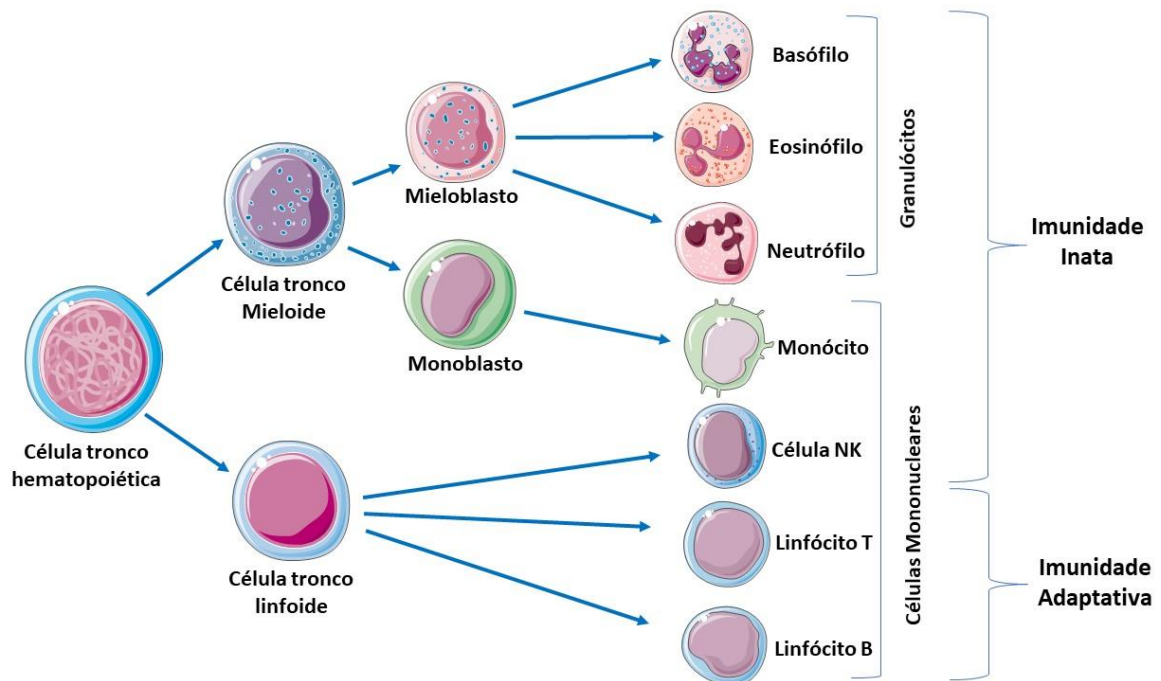


Figura 1. Formação e diferenciação dos Leucócitos. A célula tronco hematopoiética da origem a linhagem mieloide e linfoide. A linhagem mieloide se diferencia em mieloblasto, precursor dos granulócitos basófilos, eosinófilos e neutrófilos; e monoblasto, precursor dos monócitos. A linhagem linfoide é precursora das células NK e dos linfócitos T e B.

Tanto o sistema imune inato, quanto o adaptativo, são responsivos ao exercício físico. No fim dos anos 80, o grupo do professor David Nieman começou a estudar a resposta do sistema imunológico frente ao estresse promovido pelo exercício físico (NIEMAN et al., 1989; NIEMAN; JOHANSEN; LEE, 1989). Seus resultados revelaram que atletas que eram frequentemente submetidos a exercícios físicos intensos e prolongados apresentavam maior susceptibilidade para desenvolver infecções oportunistas, mais comumente chamadas de infecções do trato respiratório superior (ITRS). Entretanto, aqueles que praticavam atividade regular em uma

intensidade moderada (60-70% da capacidade máxima) apresentavam menos sintomas associados a ITRS (NIEMAN et al., 1993).

Uma sessão de exercício físico, principalmente o aeróbio, induz uma alteração profunda na composição e no número total de leucócitos circulantes; essas células aumentam de duas a cinco vezes, dependendo da duração e intensidade do exercício, e retornam aos valores de repouso de 6 a 24 horas após o término da sessão (WALSH et al., 2011). Os neutrófilos são os principais responsáveis por esse aumento, seguido pelos monócitos e pelos linfócitos.

Essa leucocitose acontece, principalmente, pelo aumento da atividade simpática que induz a liberação de catecolaminas. Estas se ligam aos receptores beta adrenérgicos expressos pelas células imunológicas fazendo com que as células migrem para periferia (SHARMA; FARRAR, 2020).

Dentre as células mobilizadas pelo exercício, aquelas que possuem funções mais efectoras e citotóxicas, e se encontram em estado de maturação e diferenciação mais avançado, são preferencialmente mobilizadas. As células NK e os linfócitos T CD8, conhecidos por terem função citotóxica, são mobilizados em maior quantidade do que linfócitos T CD4 e linfócitos B, células com baixa capacidade citotóxica (SIMPSON et al., 2016). Mesmo dentro da população de células citotóxicas, aquelas mais diferenciadas, que possuem um estágio de maturação avançado são mobilizadas em maior quantidade. Os linfócitos T CD8 com fenótipo efector de memória que expressam CD45Ra (EMRA), o último estágio de maturação, são mobilizados em maiores proporção do que os linfócitos T CD8 em estágios anteriores de maturação (Naïve, memória central e memória efectora) (CAMPBELL et al., 2009). Células que apresentam o fenótipo EMRA possuem menos capacidade proliferativa, entretanto respondem rapidamente a antígenos.

Além do mais, tanto pesquisas em humanos quanto pesquisas em modelo animal, têm mostrado que o exercício regular de intensidade moderada melhora a resposta de linfócitos a estímulos (DRELA; KOZDRON; SZCZYPIORSKI, 2004), aumentam a capacidade de fagocitose de monócitos e neutrófilos, aumentam a concentração de imunoglobulina A (IgA) (NEHLSSEN-CANNARELLA et al., 1991) e diminuem a inflamação sistêmica (BATATINHA; ROSA NETO; KRÜGER, 2019). Sugerindo que a prática de exercício físico modula a resposta do sistema imunológico, tanto de maneira aguda, como crônica (treinamento físico), podendo ser um fator protetor contra o desenvolvimento de infecções e doenças inflamatórias.

Com relação a exercícios físicos de alta intensidade e longa duração, a resposta pode ser diferente. Após uma sessão aguda, na fase de recuperação, é comum que ocorra uma linfopenia, onde os linfócitos circulantes sofrem uma queda de 30-50%, em comparação com os valores de repouso, por um período de até 6 horas (SIMPSON et al., 2015). Nesse período tanto as células da imunidade inata quanto adaptativa podem apresentar uma função reduzida. A partir daí a hipótese da “janela aberta” foi desenvolvida, onde pesquisadores sugeriram que devido à queda na função e na contagem das células imunológicas, no período de recuperação de exercícios intensos e prolongados, os atletas ficariam mais vulneráveis ao desenvolvimento de infecções oportunistas (KAKANIS et al., 2010; NIEMAN, 1994b; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 1995).

Muitos estudos acabaram associando este declínio na função de algumas células imunológicas e na produção de IgA, em resposta ao exercício físico prolongado, com o aumento de sintomas de infecções do trato respiratório superior em atletas (COUTO et al., 2013; NIEMAN, 1994a). Entretanto, estudos mais recentes mostram que este quadro aparece com mais frequência quando está associado a um outro agente estressor, como, períodos intensos de treinamento físico sem devida recuperação, competições em condições extremas (altitude, temperaturas elevadas ou muito baixas), viagens longas, estresse psicológico elevado ou distúrbios de sono (EDWARDS et al., 2018; WALSH, 2018; WALSH et al., 2011). Sugerindo que o exercício físico prolongado, por si só, não seja o principal desencadeador da queda da imunidade que pode levar a infecções oportunistas (SIMPSON et al., 2020).

Em um trabalho de revisão publicado recentemente, Campbell e Turner (2019), contrapõem essa ideia inicial de “janela aberta”. Os autores propõem que esse período ocorre devido a um aumento do estado de vigilância e regulação da atividade imunológica após o exercício físico, e que a linfopenia observada é decorrente de uma redistribuição das células imunológicas para os tecidos periféricos (ex: intestino, pulmões), locais os quais há uma facilitação para entrada de agentes invasores. Os autores sugerem, portanto, que não é correto afirmar que há uma queda geral na função do sistema imunológico após exercícios físicos prolongados; mas sim que ocorrem alterações em relação a concentração de IgA salivar e na frequência e funcionalidade dos linfócitos (CAMPBELL; TURNER, 2019). O que por si só, não levam ao aumento de quadros infecciosos.

2.2. O efeito do exercícios sob a mobilização, função e apoptose dos linfócitos

Como mencionado acima, o exercício físico agudo induz uma leucocitose transitória. Esse fenômeno começou a ser observado no fim dos anos 80, época (NIEMAN et al., 1989) em que as pesquisas na área de imunologia do exercício se intensificaram; anos depois, os cientistas desvendaram que a mobilização dos leucócitos em resposta ao exercício físico é dependente de catecolaminas (PEDERSEN et al., 1997; PETERSEN; PEDERSEN, 2006). Durante o exercício físico há uma ativação do sistema nervoso simpático (SNS), responsável por liberar catecolaminas (FRENCH et al., 2007); e, concomitantemente, do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA), induzindo o aumento de cortisol circulante minutos após o término do exercício físico (ROJAS VEGA et al., 2006). Esse movimento resulta no aumento da concentração de norepinefrina e epinefrina circulante; o que induz uma rápida mobilização de linfócitos.

Os subtipos celulares preferencialmente mobilizados são aqueles mais diferenciados, que apresentam uma função efetora aumentada, bem como, maior potencial de migração (DIMITROV; LANGE; BORN, 2010; GRAFF et al., 2018). Neste contexto, as células NK, conhecidas por seu potencial citotóxico, são as mais sensíveis a ação das catecolaminas e representam o subtipo de linfócitos mais mobilizados pelo exercício físico (BIGLEY et al., 2014; GRAFF et al., 2018). Os linfócitos T gamma-delta ($\gamma\delta$), uma subpopulação ainda pouco estudada, porém com alta capacidade citotóxica, foram descritos recentemente por serem altamente responsivos ao efeitos do exercício físico, aumentado sua concentração na circulação em resposta ao aumento das catecolaminas (BAKER et al., 2019); ainda, as células expostas a ação do exercício físico apresentaram uma capacidade de proliferação aumentada, em comparação com as células coletadas no repouso (BAKER et al., 2019). As células T CD8, outro subtipo de linfócitos citotóxicos, são também altamente mobilizadas em resposta ao exercício físico; no entanto, aquelas subpopulações que já foram expostas a antígenos e possuem um estágio de maturação elevado, são preferencialmente mobilizadas (ANANE et al., 2009b; MURRAY et al., 1992). As células Naïve, bem como os linfócitos T CD4 e linfócitos B são também mobilizados, porém, em uma magnitude menor (GRAFF et al., 2018).

A dependência das catecolaminas nesse processo foi comprovada em estudos onde os pesquisadores utilizaram outros modelos de estresse (estresse psicológico, infusão de adrenalina) e obtiveram resultados semelhantes à sessão aguda de exercício físico; linfocitose com mobilização preferencial de subtipos citotóxicos (ANANE et al., 2009a). Indo um pouco mais a fundo, os cientistas descobriram que esse efeito é dependente do receptor adrenérgico β_2 , uma vez que o bloqueio da sinalização via β_2 , mas não via β_1 , compromete a mobilização de linfócitos pelo exercício físico (BAKER et al., 2019; GRAFF et al., 2018). Contudo, os linfócitos que são preferencialmente mobilizados para circulação sanguínea, são aqueles que apresentam maior densidade e/ou sensibilidade de receptores β_2 . Células NK, linfócitos T $\gamma\delta$, e linfócitos T CD8 de memória central e memória efetora, apresentam grande concentração de receptores adrenérgicos β_2 , em comparação com células Naïve, linfócitos CD4 e linfócitos B (SLOTA et al., 2015). Estudos demonstram que o treinamento físico é capaz de aumentar a concentração de receptores adrenérgicos β_2 nas células imunológicas (GÁLVEZ et al., 2019).

É importante ressaltar que a mobilização de linfócitos, em decorrência do aumento da concentração de catecolaminas, promovido pelo exercício físico agudo, ocorre de maneira transitória e depende da intensidade e da duração da atividade. A grande maioria dos linfócitos mobilizados durante o exercício físico egressam da circulação sanguínea em questão de minutos (ROONEY et al., 2018). Em casos de exercícios físicos extenuantes, a concentração de linfócitos ao término da sessão pode ser inferior à de repouso (SIMPSON et al., 2015). Pesquisadores sugerem que esse efeito de rápida mobilização e egressão de linfócitos efetores seja uma maneira do sistema imunológico preparar o corpo para combater possíveis exposições a antígenos e realizar o reparo de possíveis lesões (DHABHAR, 1998, 2009). Os linfócitos são preferencialmente mobilizados do baço para a circulação sanguínea (PEDERSEN et al., 2016), e após a sessão de exercício físico são direcionadas para os pulmões, e para as placas de Peyer no intestino (KRÜGER et al., 2008), locais de maior contato com o meio externo (Figura 2).

Além da mobilização e tráfico dos linfócitos, as catecolaminas liberadas durante o exercício agudo também podem alterar a função das células imunológicas. Linfócitos T tendem a polarizar para o fenótipo Th2, aumentando a produção de IL-4 e diminuindo a produção de IFN γ (HUANG et al., 2015). Lancaster e colaboradores (2004) mostraram que tanto o exercício físico agudo exaustivo, quando um período

intenso de treinamento, diminuíram a capacidade dos linfócitos em produzir IFN γ quando estimulados; entretanto, após 2 semanas de recuperação, em um regime de treinamento físico menos intenso, a produção de IFN γ , pelos linfócitos, foi normalizada (LANCASTER et al., 2004). Corroborando com esse achados, Witard e colaboradores (2012) demonstram que uma semana de treinamento físico intenso reduziu a resposta neuroendócrina e a mobilização de linfócitos T CD8, quando comparado com o treinamento físico moderado (WITARD et al., 2012). Esses resultados indicam que repetidas doses de exercícios físicos extenuantes sem uma devida recuperação, podem prejudicar a vigilância do sistema imunológico.

Um outro conceito que deve ser pontuado, em relação a linfopenia observada após o exercício agudo, é a apoptose dos linfócitos. Morte por apoptose é um mecanismo natural consequente da resposta imunológica dos linfócitos, que garante a manutenção da homeostase e eliminação de células senescentes (KRÜGER; MOOREN, 2014); no entanto, apoptose exacerbada pode resultar na perda do potencial de defesa do organismo. A intensidade do exercício físico é o fator chave na indução de apoptose dos linfócitos. Estudos mostraram que, após exercícios físicos intensos, houve um aumento tanto no percentual, quanto o número total de linfócitos circulantes em apoptose (KRÜGER et al., 2009; MOOREN et al., 2002). Esse aumento parece estar muito mais relacionado com a intensidade do que com a duração. Exercícios físicos de intensidade moderada, entretanto, não apresentam relação com a indução de apoptose em linfócitos (KRÜGER et al., 2009; MOOREN et al., 2002). Efeitos similares são encontrados em órgão e tecidos. Camundongos que correram na esteira em alta intensidade apresentaram aumento dos marcadores de apoptose nos linfócitos localizados na placa de Peyer, timo, baço, pulmão e medula óssea (HOFFMAN-GOETZ; QUADRILATERO, 2003; HOFFMAN-GOETZ; ZAJCHOWSKI; ALDRED, 1999).

Assim como ocorre na circulação sanguínea, o exercício físico moderado não altera os linfócitos infiltrados nos tecidos (KRÜGER et al., 2009). O treinamento físico, no entanto, tem um efeito positivo no controle dos mecanismos de apoptose. Atletas bem treinados, apesar de ainda apresentarem linfopenia, contam com um redução na apoptose de linfócitos circulantes após a realização de exercícios físicos extenuantes e prolongados (Figura 2) (MOOREN; LECHTERMANN; VÖLKER, 2004; PETERS et al., 2006). O mesmo resultado pode ser observado para linfócitos intestinais de camundongos, após uma sessão aguda de exercício físico, camundongos não

treinados apresentaram aumento nos sinais de apoptose no linfócitos intestinais, comparado com aqueles que tiveram acesso a roda voluntária por 4 meses (DAVIDSON; HOFFMAN-GOETZ, 2006). Os mecanismos por trás desse processo parecem estar relacionados com a capacidade antioxidante celular. Linfócitos isolados do baço de camundongos treinados apresentaram ser menos sensíveis a indução de apoptose por altas concentrações de peróxido de hidrogênio (AVULA et al., 2001).

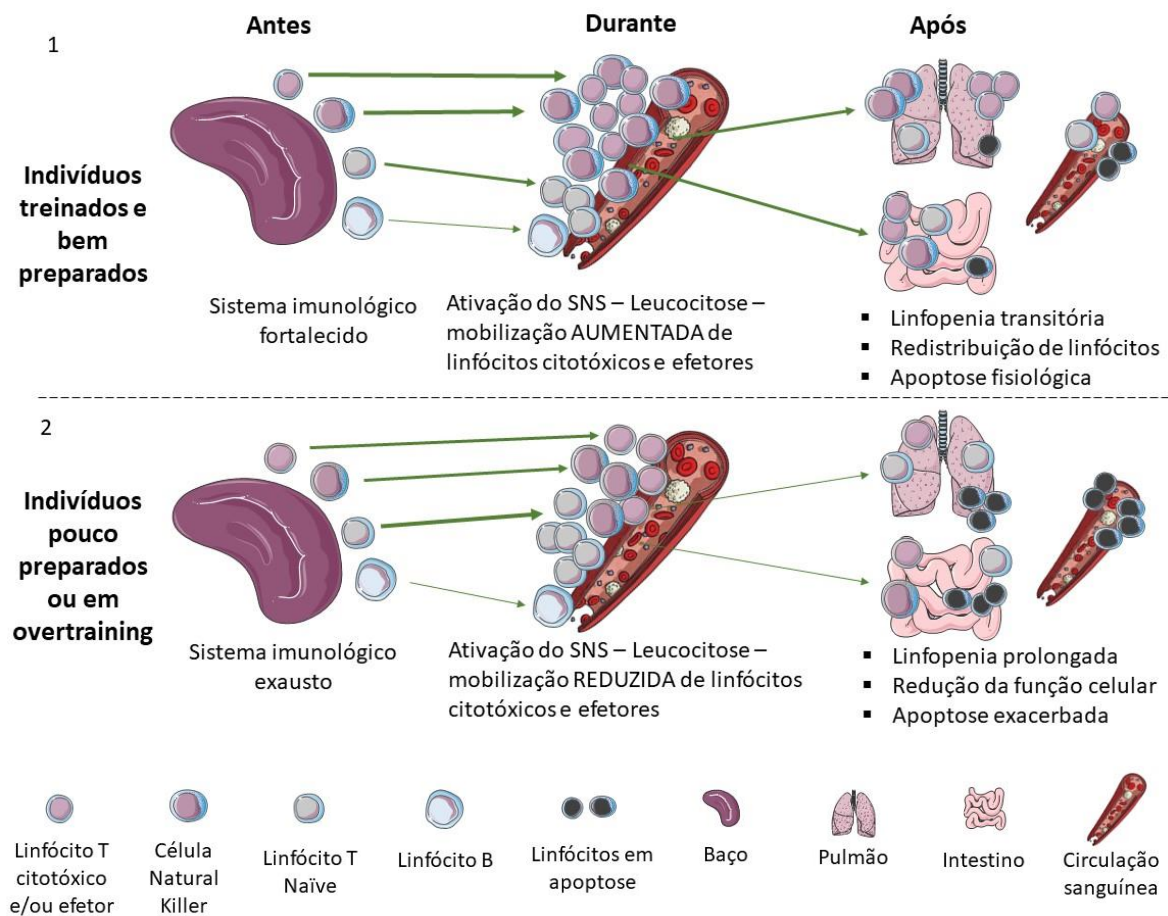


Figura 2. Comportamento dos linfócitos antes, durante e após um evento esportivo prolongado de alta intensidade. **1- Indivíduos treinados e bem preparados** chegam para o momento da prova (**antes**) com o sistema imunológico fortalecida; **durante** a prova há uma leucocitose com mobilização preferenciada de linfócitos T com características citotóxicas e efectoras, e células NK; **Após** o evento, há uma linfopenia transitória, pois os linfócitos que foram mobilizados para circulação sanguínea, são redistribuídos para órgãos periféricos como pulmão e placas de Peyer no intestino, para combater possíveis agentes invasores, aumentando o estado de vigilância. Alguns linfócitos sofrem apoptose (mecanismo natural decorrente da proliferação de linfócitos). Esse cenário não promove um risco aumentado para o desenvolvimento de infecções oportunistas. **2- Indivíduos pouco preparados ou em**

estado de overtraining chegam para o momento da prova (**antes**) com um sistema imunológico exausto e não funcional. **Durante** a prova há uma leucócitos, porém os linfócitos citotóxicos e efetores não são mobilizados com tanta frequência, como observado no quadro. **Após** o evento alguns linfócitos são direcionados para os órgãos periféricos, porém há um aumento na morte por apoptose e diminuição na função celular. Isso gera uma linfopenia estendida (por até 6 horas) aumentando o risco para o desenvolvimento de infecções oportunistas.

2.3. Linfócitos, substratos energéticos e suplementação nutricional esportiva

Como células do sistema adaptativo, os linfócitos são extremamente plásticos e possuem a capacidade de alterar seu metabolismo de acordo com a disponibilidade e o tipo de substratos no meio em que estão inseridos. De maneira geral as células naïve necessitam de baixos níveis de ATP, porém de maneira constante; para isso elas utilizam glicose e ácidos graxos como substratos energéticos e produzem ATP preferencialmente pela fosforilação oxidativa mitocondrial (MACIVER; MICHALEK; RATHMELL, 2013). Quando esse linfócito é ativado, há uma necessidade aumentada de ATP, fosfolípidios, nucleotídeos e NADPH, para que a célula possa crescer, se proliferar e exercer sua função efetora; com isso a célula altera seu metabolismo de oxidativo para glicolítico, utilizando glicose e glutamina como principais substratos energéticos (ALMEIDA et al., 2016).

A via da glicólise é utilizada para produção rápida de energia e extremamente essencial para que a célula prolifere e execute sua função efetora, além da produção rápida de ATP, a glicólise também produz NAD⁺, que é convertida em NADH e fundamental nos processos de biossíntese, que dão suporte para o crescimento e proliferação (O'NEILL; KISHTON; RATHMELL, 2016). O bloqueio da glicólise, na fase de diferenciação dos linfócitos T CD8, faz com que a célula assuma um fenótipo de memória, ao invés de uma fenótipo efetor (SUKUMAR et al., 2013). Ainda, linfócitos T que são ativados em um meio com baixa concentração de glicose, diminuem a sinalização citosólica de cálcio, levando a uma ativação defeituosa (HO et al., 2015).

A glutamina é o aminoácido mais abundante e é utilizado para síntese proteica em todos os tipos celulares. No entanto, as células imunológicas, utilizam a glutamina também para produção de energia. Com a mudança repentina do metabolismo oxidativo para o metabolismo glicolítico, durante a fase de ativação e proliferação

celular, grande parte da glicose é direcionada para via glicolítica. Com isso, a célula converte glutamina em α -cetoglutarato para servir de combustível para o ciclo de Krebs (JOHNSON et al., 2016). Neste processo a glutamina também é utilizada como doadora de nitrogênio o que suporta a síntese de nucleotídeos, fundamental para proliferação celular (JOHNSON et al., 2016). Linfócitos T cultivados em um meio privado de glutamina, falharam no processo de ativação, proliferação e produção de IL-2 (CARR et al., 2010). Células Naïve T CD4, cultivadas sem adição de glutamina no meio de cultura, não conseguem se diferenciar para Th1 efetor e aumentam a expressão de marcadores de células T regulatórias (MACIVER; MICHALEK; RATHMELL, 2013). Esses trabalhos sugerem que glicose e glutamina são substratos energéticos fundamentais para que os linfócitos possam ser ativados, se proliferem e exerçam sua função da maneira esperada.

Durante o exercício físico intenso e prolongado há uma demanda aumentada de glicose para suprir a contração muscular e o aumento da frequência cardíaca, esses eventos levam a diminuição na concentração de glicose circulante e na disponibilidade desse substrato para outros tipos celulares (GOODWIN, 2010) (como células do sistema imunológico, por exemplo). A concentração de glutamina também é alterada. Após uma sessão aguda de exercício físico intervalado de alta intensidade, a concentração de glutamina no soro encontrou-se diminuída, quando comparado com o momento basal (WALSH et al., 1998). Exercícios físicos prolongados demonstram afetar a concentração de glutamina de uma maneira mais proeminente, quando comparado com exercício físico de curta duração (ROBSON et al., 1999).

A glutamina é, em sua grande maioria, produzida, armazenada e liberada pelo músculo esquelético (AGOSTINI; BILOLO, 2010). O exercício físico moderado tem sido associado com aumento da síntese de glutamina e, concomitantemente, na sua concentração circulante. Entretanto, o exercício físico exaustivo diminui a ação da enzima glutamina sintetase, impactando negativamente na concentração de glutamina muscular e circulante (DOS SANTOS et al., 2009). Atletas que apresentam a síndrome de overtraining tem queda na concentração plasmática de glutamina de maneira crônica (CASTELL, 2003).

Essa queda na disponibilidade de substratos energéticos afeta diretamente o sistema imunológico, e é considerada, por alguns pesquisadores, como um dos fatores que contribuem para o aumento do risco de infecções oportunistas após eventos esportivos. Indivíduos que foram submetidos a dieta com baixos níveis de

carboidrato, e executaram exercício físico submáximo em uma situação de baixa disponibilidade de glicogênio, apresentaram redução na função dos linfócitos T e das células NK (WALSH et al., 2011). Nesse contexto, muitos estudos buscaram investigar os efeitos da suplementação de carboidratos e glutamina para mitigar os efeitos do exercício físico exaustivo sob o sistema imunológico.

Resultados de que a ingestão de L-glutamina é capaz de manter a concentração de glutamina plasmática após exercícios físicos prolongados e exaustivos pareciam promissores (CASTELL et al., 1997; ROHDE; MACLEAN; PEDERSEN, 1998), entretanto estudos mais detalhados mostraram que essa manutenção da concentração plasmática não tem relação direta com a função e proliferação das células imunológica (HISCOCK; PEDERSEN, 2002; KRZYWKOWSKI et al., 2001). Apesar disso, estudos em modelo animal mostram que a suplementação de glutamina foi capaz de diminuir estresse oxidativo, inflamação e lesão muscular após uma sessão de exercício físico prolongado (CRUZAT; ROGERO; TIRAPEGUI, 2010; CRUZAT; TIRAPEGUI, 2009).

Suplementação com carboidratos antes, durante e depois mostra efeitos positivos sob a função das células imunológicas. Lancaster e colaboradores (2005) mostraram que ciclistas que ingeriram 30 ou 60g de carboidrato por hora, durante 2h30min pedalando, tiveram a função dos linfócitos T CD4 e T CD8 recuperada, bem como aumento na produção de IFN γ (LANCASTER et al., 2004). Além disso, a ingestão de carboidratos antes, durante e depois uma prova de ultra endurance (2 dias de prova) aumentou a proliferação dos linfócitos T e a resposta à estimulação com antígenos (BISHOP et al., 2005). A suplementação aguda de carboidratos parece ter impacto direto na função imunológica, enquanto a glutamina parece ser importante para regeneração muscular. É importante ressaltar que os estudos com suplementação de carboidrato foram realizados em atletas saudáveis, que não apresentavam sinais de fadiga ou síndrome de overtraining. De maneira geral, uma intervenção crônica, com dieta balanceada e períodos de descanso estratégicos durante o ciclo do treinamento; com suplementação de carboidrato aguda, durante os treinos longos e nos eventos esportivos, parecem ser mais eficazes para manutenção de um sistema imunológico saudável e funcional.

2.4. Probióticos, sistema imunológico e exercício

Probióticos são microrganismos vivos que podem conferir diversos benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados de forma correta. Existem diferentes cepas, com diversas concentrações e combinações, podendo ser multi-espécies, espécie única, em uma matriz alimentar (ex: leites fermentados), capsulas ou saches. Estudos tem mostrado a utilização de probióticos como um impacto positivo no tratamento de diversas doenças inflamatórias (KANG & IM et al., 2017), como asma, artrite, síndrome do intestino irritado, diabetes mellitus tipo 2; alergias e intolerâncias como lactose (SANCHEZ, et al., 2017); e doenças de origem neurológica.

Os efeitos positivos da utilização de probióticos dependem das espécies, da concentração e do período total de uso. Os probióticos, de maneira geral, protegem o intestino contra infecções, principalmente em situações de maior susceptibilidade; entretanto, além do efeito local, esses microrganismos também possuem uma ação sistêmica, através da produção de diferentes metabólitos (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017).

Os efeitos mais conhecidos e estudados são: reduzir e neutralizar bactérias patogênicas, melhorar a função barreira, produzir neurotransmissores, modular o sistema imunológico e interagir com a microbiota residente.

A redução na colônia de bactérias patogênicas vem por meio da competição por sítios de ligação e por nutrientes e substratos para o crescimento, como prebióticos; além disso, os probióticos alteram o PH intestinal, desfavorecendo a proliferação de bactérias patogênicas, e produzem substâncias antimicrobianas (O'TOOLE; COONEY, 2008). A partir da digestão de fibras e carboidratos, os probióticos produzem ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), esse metabólitos podem ser utilizados pela microbiota residente favorecendo o aumento de colônias de bactérias comensais. Ainda, os AGCC são absorvidos pelas células epiteliais intestinais atingindo a circulação sanguínea e agindo de forma sistêmica (LI et al., 2018).

Em relação ao sistema imunológico os AGCC agem como imunomoduladores, induzindo uma resposta pró inflamatória com o intuito de aumentar a ação das células imunológicas no combate à infecções; ou uma resposta anti-inflamatória a fim de diminuir a inflamação crônica (LI et al., 2018). Além disso, os probióticos interagem com as células que compõe o GALT (do inglês: "*The gut-associated lymphoid tissue*")

–massa de tecido linfático associada as células epiteliais intestinais, composta por linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas, entre outros), melhorando a capacidade fagocítica de macrófagos, bem como a capacidade de apresentação de antígenos pelas células dendríticas; os probióticos também estimulam a produção de IL-10 e Imunoglobulina A (IgA) (BRITTI et al., 2006).

A função barreira está diretamente relacionada com a interação entre os probióticos e o sistema imunológico. A barreira intestinal é composta pelo epitélio intestinal, pela lâmina própria e pela camada de muco. As junções epiteliais possuem um papel importante na manutenção da integridade dessa barreira. Estudos com animais germ-free mostraram que a colonização com probióticos aumentou a expressão genica e proteica da zonula de oclusão, ZO-1, nas células epiteliais intestinais (UKENA et al., 2007) e a co-cultura de epitélio intestinal com o *probiótico* *L. rhamnosus* GG aumentou a proteína claudina-1 (JOHNSON-HENRY et al., 2008). Enquanto *Lactobacillus plantarum* MB452 aumentou a expressão genica e proteica de ZO-1, ZO-2, ocludina e claudina. Essas proteínas compõem a junção de oclusão, que adere as paredes celulares de células vizinhas, impedindo a passagem de microrganismos e substâncias pelo espaço intercelular (ANDERSON et al., 2010).

No contexto do esporte, a utilização de probióticos tem mostrado efeitos positivos quanto a diminuição de infecções oportunistas, bem como a melhora de sintomas gastrointestinais e diminuição da permeabilidade intestinal. Corredores suplementados com *Lactobacillus Fermentum* VRI-003 por 30 dias demonstraram redução no número de dias com sintomas de infecções o trato respiratório superior e apresentaram moderado aumento nas concentrações de IgA salivar e produção de IFN γ por linfócitos T circulantes (COX et al., 2010).

Em relação à permeabilidade intestinal, a suplementação de 28 dias com um probiótico composto por diferentes espécies (*Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *B. lactis*, *B. breve*, *B. Bifidum*, *Streptococcus thermophilus*) foi capaz de diminuir endotoxinas bacterianas circulantes e parâmetros da permeabilidade intestinal, bem como aumentar as concentrações de IL-10; em corredores, após a realização de um exercício físico até a exaustão sobre temperaturas elevadas (SHING et al., 2014).

Um trabalho recente publicado, com maratonistas amadores, demonstrou que ocorre um aumento dos sintomas gastrintestinais no último terço de uma corrida de maratona (> 30 km) e que a suplementação de um mix de probiótico (*Lactobacillus*

acidophilus, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium animalis* subs p. *Lactis*) por 28 dias, foi efetiva em minimizar a severidade destes sintomas. Além disso, os autores demonstram correlação entre o aumento dos sintomas gastrointestinais o declínio da performance (PUGH et al., 2018).

Estudos sugerem que a diminuição de sintomas gastrointestinais em atletas suplementados com probióticos, esteja relacionado com a melhora da função barreira (PYNE et al., 2015), possuindo uma correlação direta com a via de sinalização inflamatória. Os probióticos interagem com o receptor do tipo *Toll Like-2* (TLR-2), presente na superfície das células epiteliais intestinais, ativando uma cascata de sinalização via MyD88 (do inglês "*Myeloid differentiation primary response 88*"), que ativa o fator de transcrição NF- κ B, produzindo citocinas pro inflamatórias como TNF α , IFN γ e IL-6 (CARIO; GERKEN; PODOLSKY, 2007; WELLS et al., 2011). De maneira controlada, a ativação destes mediadores inflamatórios seria benéfica para preservar a integridade do epitélio intestinal, por estimular a expressão de proteínas da junção de oclusão (LEITE et al., 2019).

Embora estudos apontem resultados positivos da suplementação de probióticos em atletas, com relação aos sintomas de infecções e sintomas gastrintestinais. A interação entre os probióticos e alterações na função e atividade das células imunológicas, nesse contexto, precisam ser melhor investigadas.

3. OBJETIVO

O objetivo geral do estudo foi verificar se a suplementação com probióticos é capaz de fortalecer o sistema imunológico dos atletas amadores evitando uma imunossupressão transitória e o aparecimento de ITRS.

3.1. Objetivos específicos da proposta

- Avaliar a função e produção de citocinas pelos linfócitos e os mecanismos envolvidos neste processo;
- Verificar se há alteração nas populações de linfócitos T de memória e efetora;
- Avaliar se a suplementação de probióticos é capaz de alterar parâmetros inflamatórios sanguíneos;
- Verificar a relação entre a suplementação com probióticos e a incidências de infecções oportunistas no trato respiratório superior.

4. JUSTIFICATIVA

Estudos evidenciam que atletas que realizam provas de longa duração e alta intensidade (meia-maratona, maratona, ultramaratona, triatlão e maratona aquática) apresentam maior propensão ao desenvolvimento de infecções do oportunistas após a realização de provas alvos (aquelas em que eles vão para bater o melhor tempo). Isso acarreta uma queda de desempenho, prejudica o treinamento e aumenta a procura por ajuda médica. Além disso, o número de indivíduos que realizam esse tipo de atividade vem aumentando de maneira exponencial na última década no nosso país. Portanto o estudo de estratégias que auxiliem na manutenção do sistema imunológico nessa população é de suma necessidade.

Nas últimas décadas estudos tem evidenciado o papel importante da microbiota no desenvolvimento e fortalecimento do sistema imunológico; ainda nesse contexto a suplementação com probióticos tem surgido como uma ferramenta importante auxiliando no tratamento e prevenção de doenças crônico inflamatórias. No entanto são escassos os estudos que avaliam os efeitos da suplementação de probióticos no sistema imunológico dos atletas de endurance.

O melhor entendimento da associação entre microbiota e probióticos e sistema imunológico, nessa população específica (corredores de longa distância) auxiliará em medidas alternativas que poderão reduzir substancialmente a incidência das infecções oportunistas, evitando que esta evolua para quadros mais graves como pneumonia (infecção do trato aéreo respiratório inferior). Além disso, a remissão ou prevenção desses episódios permitirá uma melhor recuperação pós-prova, permitindo assim a recuperação mais rápida para o treinamento do atleta, além de diminuir possíveis problemas de saúde pública.

5. MÉTODOS

5.1. Procedimentos Éticos

A participação no estudo ocorreu após explicação e detalhamento dos objetivos e procedimentos metodológicos, e para o cumprimento das diretrizes de ética em pesquisa com seres humanos, estabelecidas pela resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012), os sujeitos interessados em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) na primeira visita ao laboratório. Foi garantido sigilo de todas as informações fornecidas e resultados obtidos, sendo concedido para estes os resultados de seus exames. O material coletado foi utilizado exclusivamente na pesquisa proposta, e os resultados obtidos foram divulgados em publicações científicas, sejam eles favoráveis ou não, sem mencionar nenhum dado pessoal dos sujeitos participantes da pesquisa. Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética em pesquisa envolvendo seres humanos do instituto de ciências biomédicas da Universidade de São Paulo e da plataforma Brasil número CAAE: 61892116.9.0000.5467

5.2. Amostra

100 corredores de maratona foram contatados para fazerem parte do estudo. 42 decidiram não participar, 18 foram excluídos pois apresentavam um ou mais critérios de exclusão e 2 não participaram por outros motivos. 38 atletas foram randomizados duplo cego em grupo placebo (n=19) e probiótico (n=19). 5 sujeitos do grupo placebo e 6 do grupo probiótico descontinuaram a intervenção por problemas gastrointestinais e/ou lesões. Os resultados apresentados são referentes a 27 atletas (placebo n=14; probiótico n=13).

O tamanho da amostra foi determinado através de estudo piloto prévio e com auxílio do site de estatística do governo australiano (*National Statistical Service, 2012*) sendo considerado um tamanho do efeito (*effect size*) moderado ($d = 0,25$), poder de explicação (Power) de 0,80 e um nível de α igual a 0,05. (*National Statistical Service, 2012*).

5.2.1. Critérios de Inclusão

- Praticantes de corrida por no mínimo 2 anos;
- Treinamento mínimo de 5x por semana;
- Idade entre 20-50 anos;

- Eutróficos.

5.2.2. Critérios de Exclusão

- Apresentar problemas de saúde (Doenças cardiovasculares, respiratórias, crônico degenerativas, distúrbios psicológicos ou em tratamento psiquiátrico conforme avaliação médica);
- Fazer uso regular de alimentos que contenham probióticos;
- Apresentar alterações no Eletrocardiograma (ECG) de repouso e de esforço e na avaliação clínica conduzida por um médico que inviabilize a realização de exercício físico;
- Ser fumante e/ou usar drogas de abuso;
- Fazer uso de qualquer medicamento que pudesse interferir nos resultados do estudo (antifúngico e/ou antibiótico nos últimos 6 meses, anti-inflamatórios nos últimos 15 dias e que fizessem uso de anabolizantes);
- Fazer uso de qualquer suplemento, que não seja carboidratos, proteínas e vitaminas os quais serão registrados.

5.3. Protocolo experimental

Os maratonistas compareceram ao laboratório um mês antes da prova onde assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, fizeram a avaliação corporal pelo método do bodyPod (item 5.4), fizeram a primeira coleta de sangue (item 5.5) (correspondente ao momento basal), responderam ao questionário de frequência alimentar e foram orientados a preencher um recordatório de treinos por 30 dias (item 5.11)

Neste momento eles foram randomizados de forma aleatória com auxílio do programa MINITAB® em um modelo duplo cego, em grupo suplementado e grupo placebo. O grupo suplementado recebeu 30 saches contendo *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* (10×10^9) e *Lactobacillus Acidophilus* (10×10^9) associados a 5g de maltodextrina, enquanto o grupo placebo recebeu 30 saches de mesmo formato, cor e textura, contendo 5g de maltodextrina. Eles foram orientados a consumir 1 sache por dia dissolvido em água, preferencialmente antes de dormir, até o dia da prova (totalizando 30 dias de suplementação). Todos os atletas foram contatados de forma individual 3 vezes por semana durante todo o período de suplementação; neste

contato eles reportavam qualquer sintoma associado a suplementação, e se estavam consumindo o suplemento de maneira adequada.

No dia anterior à maratona os atletas retornaram ao laboratório para outra coleta de sangue (momento pré), eles responderam novamente o questionário de frequência alimentar e entregaram o recordatório de treino referente aos 30 dias antecedentes a prova.

No dia da prova foi armada uma estrutura para receber os atletas com os objetos necessários para coleta de sangue com uma enfermeira responsável para realizar os procedimentos. Logo após o término da maratona os atletas se dirigiram à tenda. A coleta de sangue foi realizada uma hora após o tempo reportado em que eles cruzaram a linha de chegada (momento pós).

Cinco dias após a prova os maratonistas retornaram ao laboratório para a última coleta de sangue (momento recuperação).

Do dia 1 ao dia 10 após a maratona os atletas responderam um questionário online sobre sintomas e severidade dos sintomas de infecções do trato respiratório superior.

A figura abaixo ilustra o desenho experimental (Figura 3).

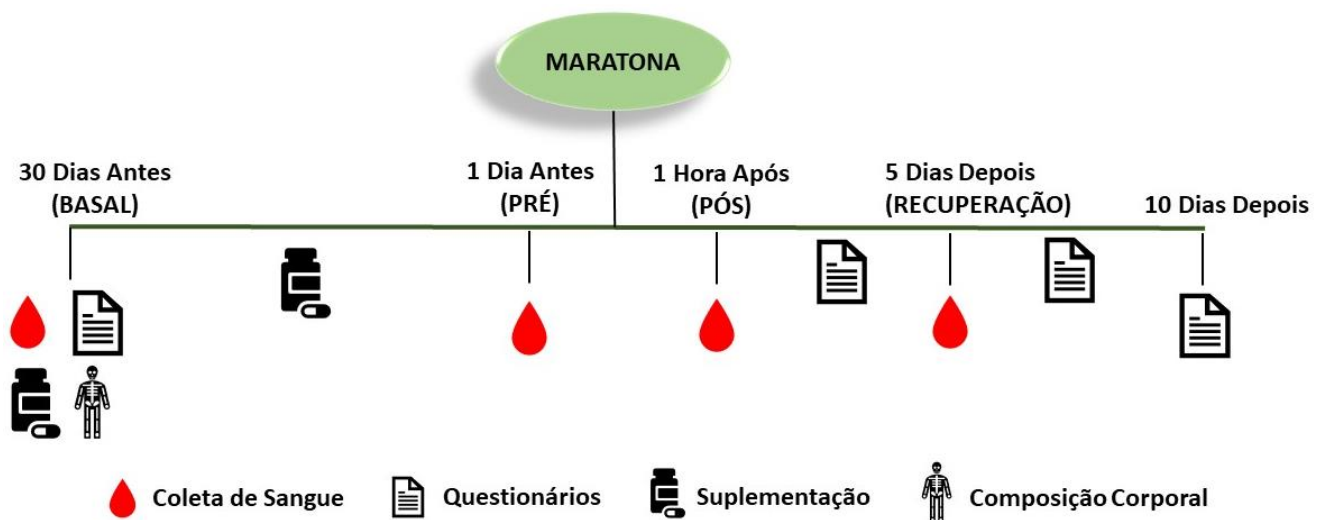


Figura 3: Ilustração do Desenho experimental.

5.4. Composição corporal

A massa corporal foi aferida em uma balança com precisão de 0,1g. A estatura foi mensurada com auxílio de um estadiômetro vertical com precisão de 1mm. A gordura corporal e massa muscular foram determinadas por meio da pletismografia, de corpo inteiro (*air displacement plethysmography*, BOD POD® *body composition system*; Life Measurement Instruments, Concord, CA, USA). (FIELDS; GORAN, 2000;

FIELDS; HUNTER; GORAN, 2000). Antes das avaliações o aparelho foi calibrado utilizando um cilindro com volume conhecido (50.173 litros) seguindo as orientações do manual. A balança utilizada para obter o peso corporal é acoplada ao aparelho e foi calibrada antes de cada teste utilizando-se um referencial conhecido de 20kg. Após esta calibração, os voluntários foram avaliados usando roupa de banho e touca de natação e não foi permitido o uso de óculos ou objetos metálicos como brincos, anéis, correntes, piercing etc. Para realização do teste os voluntários estavam em jejum de pelo menos 3 horas.

O processo de avaliação foi realizado a partir das instruções do manual. Os dados pessoais do voluntário são incluídos no *software*. Em seguida, é realizada uma pré-calibração exigida pelo equipamento e, logo após, o voluntário é pesado na própria balança do aparelho que possui sensibilidade de três casas decimais. Então, ele é orientado a entrar no aparelho, ficar sentado sem se movimentar durante o teste, respirando normalmente. Cada mensuração total leva em média dez minutos. O método de avaliação da composição corporal baseia-se nos dados inseridos no *software* e no volume ocupado pelo voluntário, observando-se o princípio de Boyle. Assim, foram medidas as variações entre a pressão e o volume para se determinar a densidade corporal do sujeito.

5.5. Coleta de Sangue

Para medida dos parâmetros bioquímicos foram coletados em cada um dos diferentes momentos 30ml de sangue, 20ml em tubo de EDTA e 10ml em tubo seco. O sangue coletado em EDTA foi utilizado para cultura de células, imunofenotipagem, hemograma e para análise do sangue total estimulado, e os 10ml coletados em tubo seco foram centrifugados a 3000rpm durante 15 minutos a 4°C para extração do soro; metade do soro foi utilizada na cultura de células e a outra metade foi armazenada em freezer -80°C para posteriores dosagens.

5.6. Sangue total estimulado

5ml de sangue coletados em tubo contendo EDTA foram divididos em 2 tubos falcon, contendo 2ml em cada; em um dos tubos foi acrescentado 200ul de LPS. Todos os tubos foram agitados por 1h. Após esse período foram centrifugados a 3000 rpm

durante 15 minutos a 4°C para extração do soro, o qual foi armazenado em freezer - 80°C para posteriores dosagens.

5.7. Análises Bioquímicas

A concentração das citocinas interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-1 β , Fator de necrose tumoral Alpha (TNF α) e Interferon-Gama (IFN γ) no soro resultante do sangue total estimulado e no meio de cultura dos Linfócitos foi obtida utilizando o kit *multiplex* obtidos da empresa R&D Systems, USA

5.8. Cultura de células e isolamento dos linfócitos

Para cultura e isolamento dos linfócitos um tubo de EDTA contendo 5ml de sangue total foi lavado com 3ml de PBS. A solução total foi colocada em um falcon contendo 3ml de hitopaque 1119 e 3ml de hitopaque 1077 (nesta ordem). O falcon foi centrifugado a 1800rpm por 30 minutos para separação dos granulócitos e PBMC (do inglês: *peripheral blood mononuclear cells*). Após esse processo tanto os granulócitos quando as PBMCs foram lavadas com PBS e centrifugadas por 10 minutos a 1800rpm a 4 graus. Então, o sobrenadante foi descartado e o pelet gerado por este processo foi ressuspendido em meio de cultura enriquecido com 10% do soro do próprio atleta e 2% de penicilina. As PBMCs foram então plaqueadas em placa costar de 6 poços e deixadas em estufa por 2 horas para que os monócitos pudessem aderir a placa e os linfócitos ficassem no sobrenadante. Após esse período o meio contendo linfócitos foi coletado.

Os linfócitos foram plaqueados em placa costar de 96 poços (5x10⁵ células/poço), estimulados com 1ul de PMA e mantidos em estufa por 48h. Após esse período o meio com as células em suspensão foi coletado, centrifugados por 10 minutos a 1800rpm a 4 graus. O sobrenadante foi armazenado para análise da produção de citocinas e o pellet de células armazenado para extração de RNA.

5.9. Imunofenotipagem de sangue total

Para a imunofenotipagem foi utilizado o sangue coletado em tubo de EDTA. Foram separados 100ul de sangue total em um tubo de ensaio e acrescido 2ml de RBC Lysis Solution, obtido da empresa QUIAGEM, USA. O tubo foi mantido a 37 graus por 10 minutos; centrifugado a 1800rpm por 10 minutos. As células formaram um pelet, o qual foi lavado duas vezes com PBS (com centrifugação entre as lavagens). Após a última centrifugação os linfócitos foram marcados com CD45 (PERcP – BL3), CD3

(FITC-BL1), CD4 (APC-RL1), CD8 (PE- BL2), CD45Ra (Alex700 – RL2) e CD27 (Pacific Blue – VL1). Os tubos foram encubados na ausência de luz durante 30min. Após esse período foram lavados com PBS, centrifugados e o pelet final foi ressuspensionado com PBS 2% BSA. A leitura foi executada no citometro de fluxo (figura 4) Attune NxT da empresa Thermo Fisher Scientific, USA.

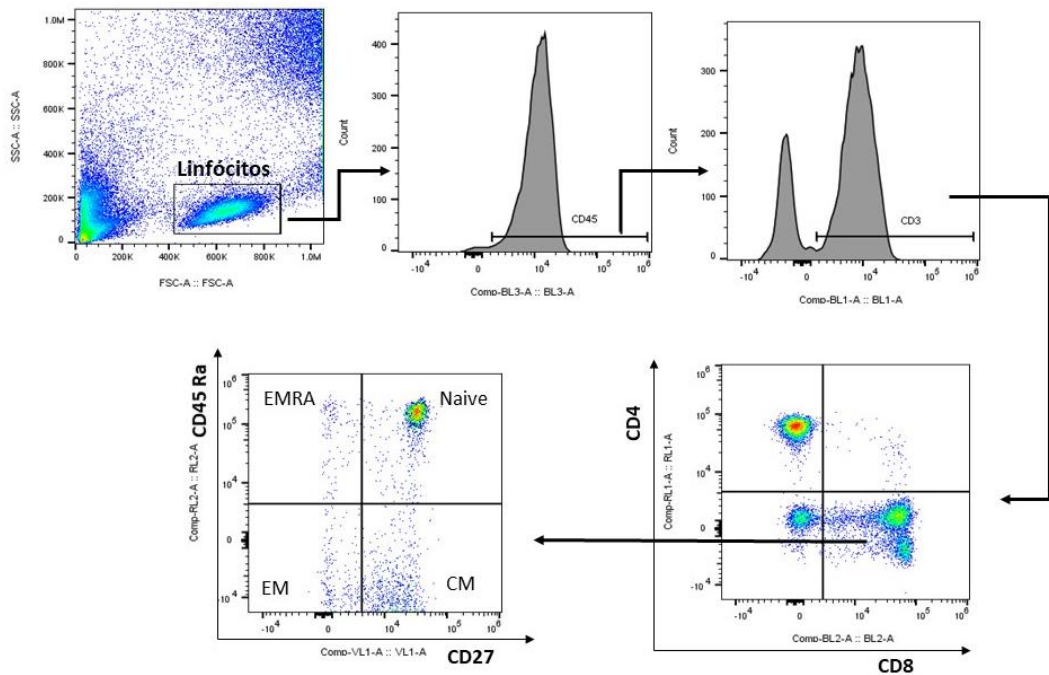


Figura 4. Estratégia de gating para os linfócitos T analisados por citometria de fluxo. CD45 (PERcP – BL3), CD3 (FITC-BL1), CD4 (APC-RL1), CD8 (PE- BL2), CD45Ra (Alex700 – RL2) e CD27 (Pacific Blue – VL). memória central (CM), memória efetora (EM), memória efetora RA (EMRA).

5.10. Extração de RNA e PCR real-time

O RNA total dos linfócitos foi extraído como descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) e quantificado no espectrofotômetro (260 nm/280 nm) (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total por transcriptase reversa utilizando o kit high-capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster, CA). A expressão genica foi quantificada por PCR real-time utilizando SYBR power Green Master Mix (Applied Biosystems) como agente fluorescente. GAPDH foi utilizado como controle endógeno. A sequência dos primers está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados para análise da expressão gênica

<i>Gene</i>	<i>Primer Forward</i>	<i>Primer Reverse</i>
<i>PLZF</i>	GAGATCCTCTTCCACCGCAAT	CCGCATACAGCAGGTCATC
<i>RORC</i>	GTGGGGACAAGTCGTCTGG	AGTGCTGGCATCGGTTTCG
<i>TLR-4</i>	TTTGCTCTTATGGATTGTCCCC	CATTGATGCAGCACAGTTGTC
<i>NF-κB</i>	GAAGCACGAATGACAGAGG	GCTTGGCGGATTAGCTCTTTT
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC

5.11. Questionários

5.11.1. Questionário de Consumo e Frequência alimentar

A fim de avaliar o consumo energético e de macronutrientes (carboidratos, proteína e lipídeos) foram aplicados o questionário de frequência alimentar ELSA-BRAZIL (MOLINA et al., 2013) e o diário alimentar de três dias. O Questionário de Frequência Alimentar – Foi aplicado no momento basal, a fim de mensurar os hábitos alimentares dos voluntários. O Diário alimentar de três dias não consecutivos (sendo 2 dias da semana e 1 dia do fim de semana) foi administrado em dois momentos distintos, após a entrevista inicial e na semana que precede a prova. Estes questionários foram aplicados por uma nutricionista treinada e capacitada.

5.11.2. Questionário de Infecções do Trato Respiratório Superior (QITRS)

O monitoramento dos sintomas de infecções do trato respiratório superior foi realizado a partir do questionário Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey – 21 (WURSS – 21), proposto por Barret e colaboradores (BARRETT et al., 2005). O questionário contém 21 questões do tipo survey, que buscam avaliar informações relacionadas à saúde, que são negativamente afetadas por sintomas de resfriados comuns. Todos os itens são baseados em uma escala do tipo Likert de 0 a 7 pontos.

5.11.3. Recordatório de treinos

O Volume de treino dos voluntários foram expressos a partir da média das distâncias percorridas utilizando o logaritmo descrito por (Damasceno et al., 2014). As medidas foram coletadas por meio de um registro de treino preenchido durante todo o período de suplementação.

5.12. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão da média (DPM) e analisados por *Anova two-Way com medidas repetidas*, seguido por Tukey como teste post-hoc. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GRAPHPAD PRISM 8.0. Os dados são significativamente diferentes se $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da amostra

Estão descritos na tabela 2 dados amostrais dos grupos placebo e probiótico. Para as variáveis, Idade, Altura, Massa Corporal Total e Massa Livre de Gordura, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos. Já no que se refere a Massa Gorda ($p=0,01$) e Densidade Corporal ($p=0,02$) foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 2- Dados descritivos da amostra

	<i>Placebo</i>	<i>Probiótico</i>	<i>P</i>
<i>Idade (anos)</i>	40,46 ± 7,79	35,96 ± 5,81	0,09
<i>Altura (metros)</i>	1,75 ± 0,08	1,75 ± 0,06	0,78
<i>MCT (kg)</i>	72,67 ± 10,20	79,30 ± 10,99	0,11
<i>MG (kg)</i>	11,32 ± 4,40	16,79 ± 5,80*	0,01
<i>MLG (kg)</i>	61,12 ± 9,03	62,51 ± 6,78	0,89
<i>DC (kg/l)</i>	1,06 ± 0,01	1,05 ± 0,01*	0,02

Dados apresentados em média ± desvio padrão, *diferente do placebo. Significância $p < 0,05$
 Legenda: MCT- Massa Corporal Total; MG – Massa Gorda; MLG- Massa Livre de Gordura; DC- Densidade Corporal.

Na Tabela 3 estão descritos os dados relacionados ao volume de treino realizado durante os 30 dias antecedentes à maratona. Para o tempo de prova o grupo probiótico apresentou diferença significativa em relação ao grupo placebo ($p=0,04$) apresentando tempo de prova superior. Em relação ao período de treino precedente a prova, não foram encontradas diferenças estatísticas para o tempo gasto por semana e os quilômetros percorridos, sugerindo um volume de treino semelhante entre os grupos.

Tabela 3 - Recordatório de treino

Tempo de Treino (h)								
	Semana 1	p	Semana 2	p	Semana 3	p	Semana 4	p
PLA	4,03±2,24	0,3	4,28±0,52	0,9	3,33±2,08	0,95	4,11±2,08	>0,99
PRO	6,30±3,33		5,31±2,30		4,28±2,38		4,26±2,52	

Distância Percorrida (km)								
	Semana 1	p	Semana 2	p	Semana 3	p	Semana 4	p
PLA	44,08±27,7	0,9	54,90±28,5	>0,99	74,48±57,2	0,91	77,48±85,61	0,75
PRO	69,21±29,9		62,67±25,4		48,28±24,7		44,10±22,1	

Legenda: KM= Quilômetros; H=Horas ; PLA= Grupo Placebo; PRO= Grupo Probiótico

Os dados foram coletados em 3 diferentes provas de maratona durante os anos de 2017 e 2018. As condições climáticas no início das competições e o número de atletas de cada competição são apresentados na Tabela 4. Estão incluídos no número de participantes apenas aqueles que completaram todos os processos do protocolo experimental. Em nenhuma das provas houve associação entre temperatura e humidade relativa do ar elevada, o que facilitaria um quadro de desidratação nos atletas.

Tabela 4 - Dados descritivos das provas de maratona realizadas nos anos de 2017 e 2018

<i>Prova</i>	<i>Temperatura</i>	<i>URA</i>	<i>Atletas</i>
City Marathon 2017[®]	19°C	77%	7
Maratona Internacional de São Paulo 2018[®]	15°C	86%	7
City Marathon 2018[®]	21°C	55%	13

Legenda: URA- Umidade relativa do ar

Nos momentos basal e pré, os atletas responderam um questionário sobre consumo alimentar. Os dados estão apresentados na Tabela 5. Não foram

encontradas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos para o consumo energético total, macronutrientes e fibras.

Tabela 5 - Dados referentes ao consumo alimentar dos atletas 30 dias (basal) e 1 dia antes da prova (pré)

	<i>Basal</i>		<i>P</i>	<i>Pré</i>		<i>p</i>
	<i>Placebo</i>	<i>Probiótico</i>		<i>Placebo</i>	<i>Probiótico</i>	
<i>ET(kcal)</i>	2514,9 ± 962,9	2948,6±1105,4	0,8	2282,6±577,5	2617,6±974,2	0,8
<i>Cho (g)</i>	342,8± 162,03	385,2 ±197,1	0,9	317,3±142,9	342,8±164,3	0,9
<i>Prot (g)</i>	106,9 ±44,4	136,5±97,9	0,4	88,8 ±21,08	128,2±30,7	0,3
<i>GT (g)</i>	104 ±48,5	94,6 ± 40,4	0,5	74,6± 38,3	81,4±34,6	0,9
<i>GS (g)</i>	36,8 ±16,7	29,5±22,4	0,3	24,2±19,4	23,7± 10,5	0,8
<i>GM (g)</i>	21,6 ±14,1	19,2±13,8	0,9	11,3±5,34	14,8±6,9	0,9
<i>GP (g)</i>	8,6 ± 6,1	7,8 ± 3,6	0,3	13,2 ±10,7	6,6 ±4,6	0,9
<i>Col(mg)</i>	474,4±250,8	469,8 ±384,2	0,9	377,6 ± 363,4	491,1 ±397,0	0,9
<i>Fb (g)</i>	23,6 ± 10,5	25,6± 15,6	0,9	24,9± 19,1	15,6±15,2	0,7

Legenda: ET= energia total; CHO= Carboidratos; PROT= proteínas; GT= gordura total; GS= gordura saturada; GM= gordura monosaturada; GP= Gordura poliinsaturada; COL=colesterol; Fb = fibras.

Logo após a maratona os atletas responderam um questionário simplificado sobre o consumo alimentar durante a prova. Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação ao consumo energético total, macronutrientes e fibras.

TABELA 6 - Dados referentes ao consumo alimentar dos atletas durante a prova de maratona

	<i>Durante a prova de Maratona</i>		p
	Placebo	Probiótico	
ET(kcal)	526,36±317,97	678,20±172,88	0,56
Cho (g)	109,07± 60,74	137,66±112,66	0,41
Prot (g)	4,60± 8,47	9,49±29,55	0,56
GT (g)	7,98 ±16,52	11,41±28,33	0,70
GS (g)	0,79±2,57	2,46±8,44	0,49
GM (g)	0,12±0,38	0,94±3,47	0,65
GP (g)	0,23±0,69	0,44±1,54	0,39
Col(mg)	0	24,98±93,29	0,33
Fb (g)	1,58±1,76	2,30±4,20	0,59

Legenda: ET= energia total; CHO= Carboidratos; PROT= proteínas; GT= gordura total; GS= gordura saturada; GM= gordura monosaturada; GP= Gordura poliinsaturada; COL=colesterol; Fb = fibras.

6.2. Produção de citocinas no sangue total estimulado

Em cada um dos momentos de coleta, o sangue total dos atletas foi estimulado por uma hora com LPS, e a produção de citocinas foi avaliada no plasma. Um Sangue não estimulado foi utilizado como controle. As diferenças observadas foram em relação ao estímulo com LPS e ao tempo, e não entre os grupos; por esse motivo, e para uma melhor visualização, as figuras estão separadas em placebo (Figura 5) e probiótico (Figura 6). IL-4 e INF γ não foi alterado em relação ao estímulo e ao tempo para nenhum dos grupos (Figuras 5A e 6A); no entanto, ambos os grupos apresentaram um aumento de IL-10 no momento pós, independente do estímulo com LPS(Figuras 5B e 6B), esses valores voltaram ao próximos ao basal 5 dias após (momento rec). Apesar de não estatístico, IL-6 seguiu o mesmo padrão da IL-10; e, de maneira interessante, nos momentos basal, pré e rec o grupo probiótico produziu IL-6 apenas sob estímulo (Figura 6D). IL-2 foi responsiva ao LPS apenas no grupo probiótico (Figura 6E); já IL-15, respondeu de maneira similar em ambos os grupos (Figuras 5F e 6F). Para ambos os grupos IL-8 aumentou de forma significativa quando estimulado apenas no momento pós (Figuras 5G e 6G). Para o grupo placebo IL-1B e

TNF α responderam significativamente ao estímulo apenas no momento pré (Figuras 5H-I). Já no grupo probiótico a produção de TNF α foi aumentada, sob estímulo, nos momentos basal e pré; e IL-1B nos momentos basal, pré e pós (Figuras 6H-I).

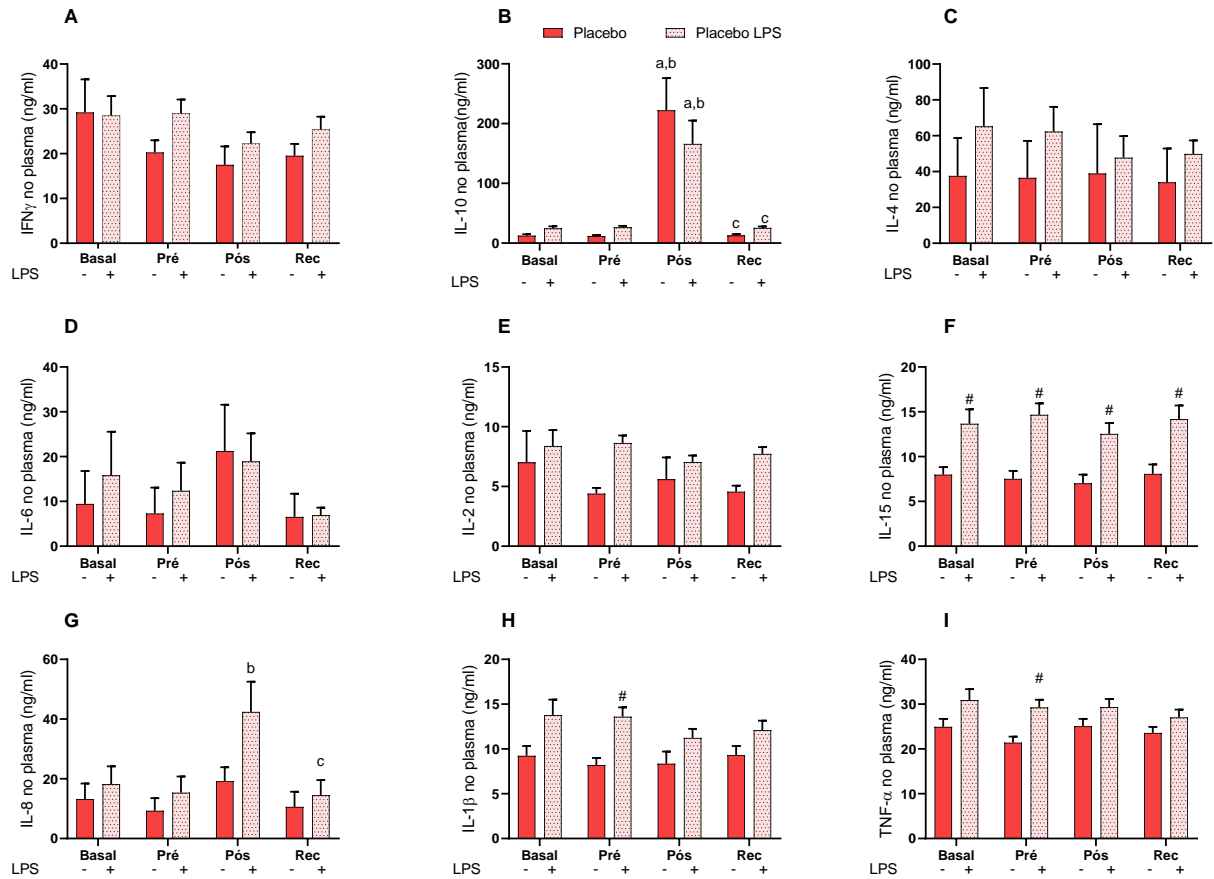


Figura 5. Produção das citocinas no sangue total dos aletas do grupo placebo, IFN γ (A), IL-10 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-2 (E), IL-15 (F), IL-8 (G), IL1 β (H), TNF- α (I), sem estímulo (barra vermelha sólida n=14) ou estimulado por uma hora com LPS (barra rosa rajada n=13); nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. ^b p<0,05 comparando com Pré. ^c p<0,05 comparando com Pós. # p<0,05 comparando entre com e sem estímulo (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

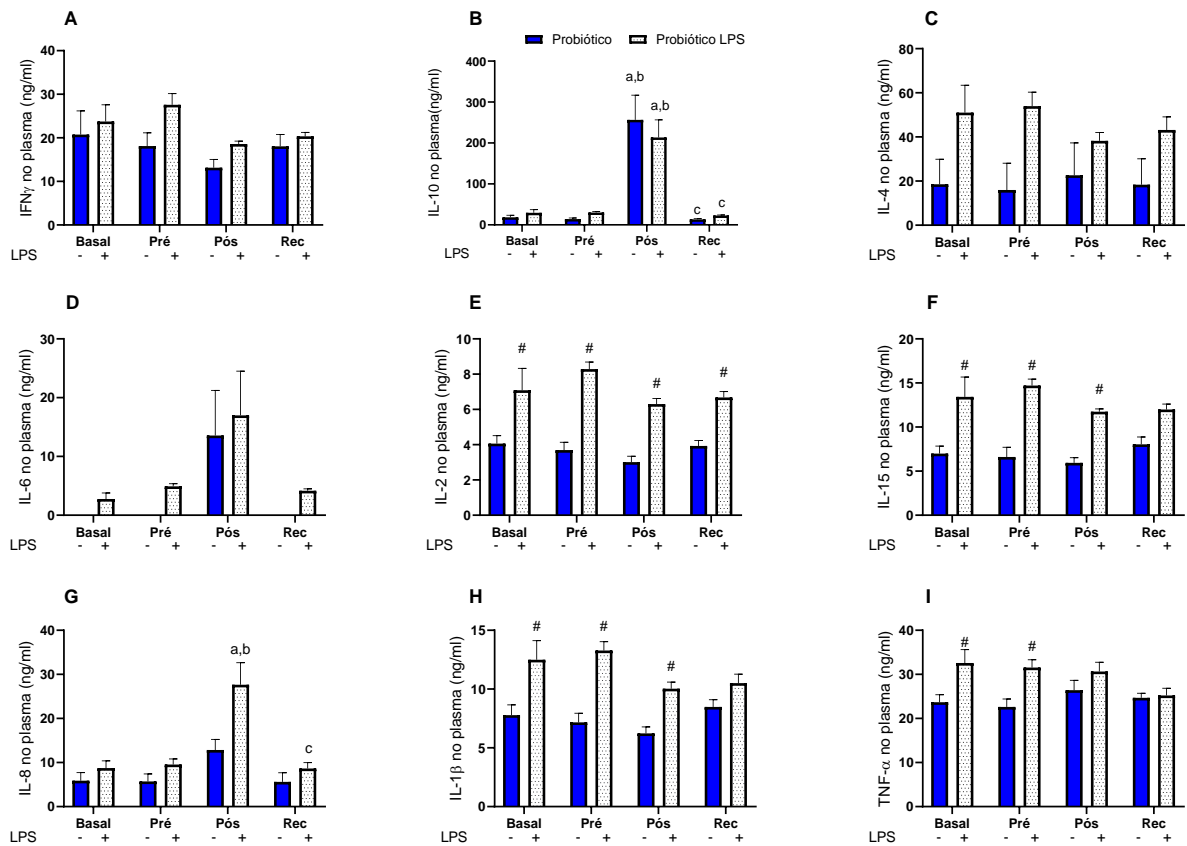


Figura 6. Produção das citocinas no sangue total dos atletas do grupo probiótico, IFN γ (A), IL-10 (B), IL-4 (C), IL-6 (D), IL-2 (E), IL-15 (F), IL-8 (G), IL1 β (H), TNF- α (I) ; sem estímulo (barra azul sólida n=14) ou estimulado por uma hora com LPS (barra branca rajada n=13); nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. ^b p<0,05 comparando com Pré. ^c p<0,05 comparando com Pós. # p<0,05 comparando entre com e sem estímulo (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.3. Contagem completa das células do sangue dos atletas

Para analisar as células presentes no sangue, foi realizado um hemograma completo em todos os tempos de coleta sanguínea. Na Tabela 7 estão descritas a serie vermelha. A concentração de hemoglobina corpuscular média a partir do teste estatístico realizado (análise multivariada) foi encontrada uma interação para o fator tempo (p<0.01), porém após a realização do post hoc (Tukey), não foram encontradas

diferenças significantes. Não foram encontradas diferença para nenhum dos demais parâmetros descritos.

Tabela 7 – Serie vermelha no sangue dos atletas nos diferentes momentos.

Parâmetro		Basal	Pré	Pós	Rec	p
Hemácia (x106/ul)	PLA	5,07± 0,22	5,04±0,27	4,95±0,39	5,03±0,29	0,9
	PRO	5,26±0,41	5,22±0,43	5,32±0,52	5,24±0,49	
HGB (g/dl)	PLA	15,26±0,84	15,06±0,80	14,01±0,98	15,27±0,76	0,8
	PRO	15,48±0,84	14,92±0,63	15,25±1,06	15,07±0,84	
HCT (%)	PLA	45,2±1,96	45,33±2,14	42,5±2,77	45,17±2,02	0,9
	PRO	44,90±2,09	45,08±1,75	45,57±2,66	44,57±2,37	
VCM (fL)	PLA	89,21±3,47	89,87±2,97	85,9±3,07	88,83±2,48	0,9
	PRO	85,73±6,29	87,12±6,77	86,07±6,93	85,55±7,04	
HCM (pg)	PLA	30,10±1,14	29,86±1,22	28,5±1,27	30,01±0,86	0,8
	PRO	28,98±2,46	28,84±2,55	28,82±2,49	28,96±2,58	
CHC (g/dl)	PLA	33,76±0,81	33,23±0,92	33,2±0,82	33,81±0,79	0,1
	PRO	33,77±0,67	33,06±0,79	33,46±0,95	33,82±0,50	
Plaquetas (x103/ul)	PLA	221,63±76,82	236,46±32,6	223±42,37	239,25±35,74	0,1
	PRO	234,26±54,80	232±38,74	248,73±36,3	245,57±52,03	

Legenda: PLA=Placebo; PRO= Probiótico; HGB = Hemoglobina; HCT = Hematócrito; VCM= Volume Corpuscular médio; HCM= Hemoglobina Corpuscular Média; CHC=Concentração de Hemoglobina

Quanto a serie branca, observa-se que a população de leucócitos é drasticamente aumentada após a maratona e retorna próximo aos níveis basais no período de recuperação (Figura 7A), não houve diferença entre o grupo suplementado e placebo. Os grandes contribuintes para esse aumento de leucócitos são os Neutrófilos (Figura 7B), seguidos pelos monócitos (Figura 7C). Os linfócitos, entretanto, apresentam um resultado contrário, diminuindo a quantidade 1h após a maratona e retornando próximo aos valores basais 5 dias após a prova (Figura 7D).

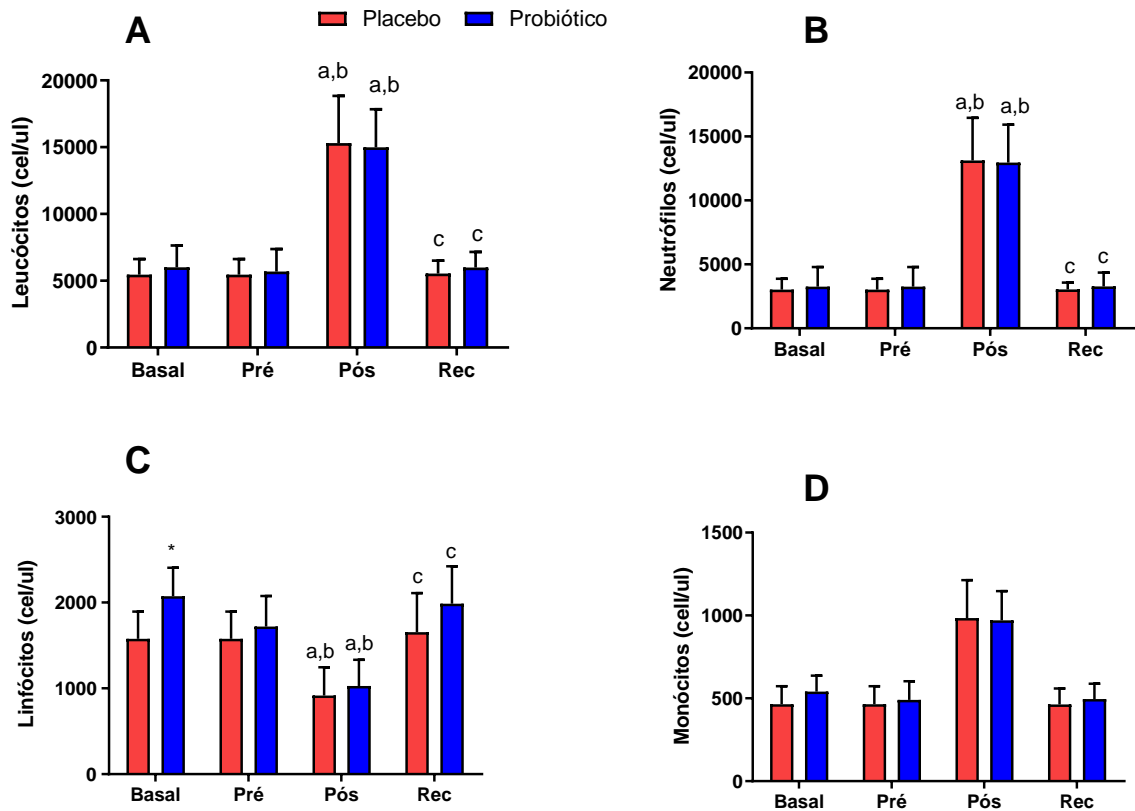


Figura 7. Contagem da série branca (A) Leucócitos, (B) Neutrófilos, (C) Linfócitos e (D) Monócitos; do sangue dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=14) e probiótico (barra azul n=13); nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando Basal. ^b p<0,05 comparando com Pré. ^c p<0,05 comparando com Pós. * p<0,05 comparando entre grupos (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.4. População de linfócitos T

Para avaliar a população de linfócitos presente no sangue dos atletas foi utilizada a técnica de imunofenotipagem no sangue total por citometria de fluxo. A População de células CD3 diminuiu para ambos os grupos 1 hora após a corrida (pós), entretanto apenas os atletas suplementados com probióticos apresentaram uma recuperação significativa na quantidade dessas células 5 dias após (rec). T CD4 diminuiu significativamente no momento pós em relação ao basal para o grupo probiótico (Figura 8C). Já para os linfócitos T CD8, apenas o grupo placebo apresentou uma queda significativa na quantidade total 1 hora após a maratona,

comparando com o momento pré (Figura 8D). A razão CD4/CD8 não foi alterada nem entre os grupos nem entre os momentos (Figura 8E).

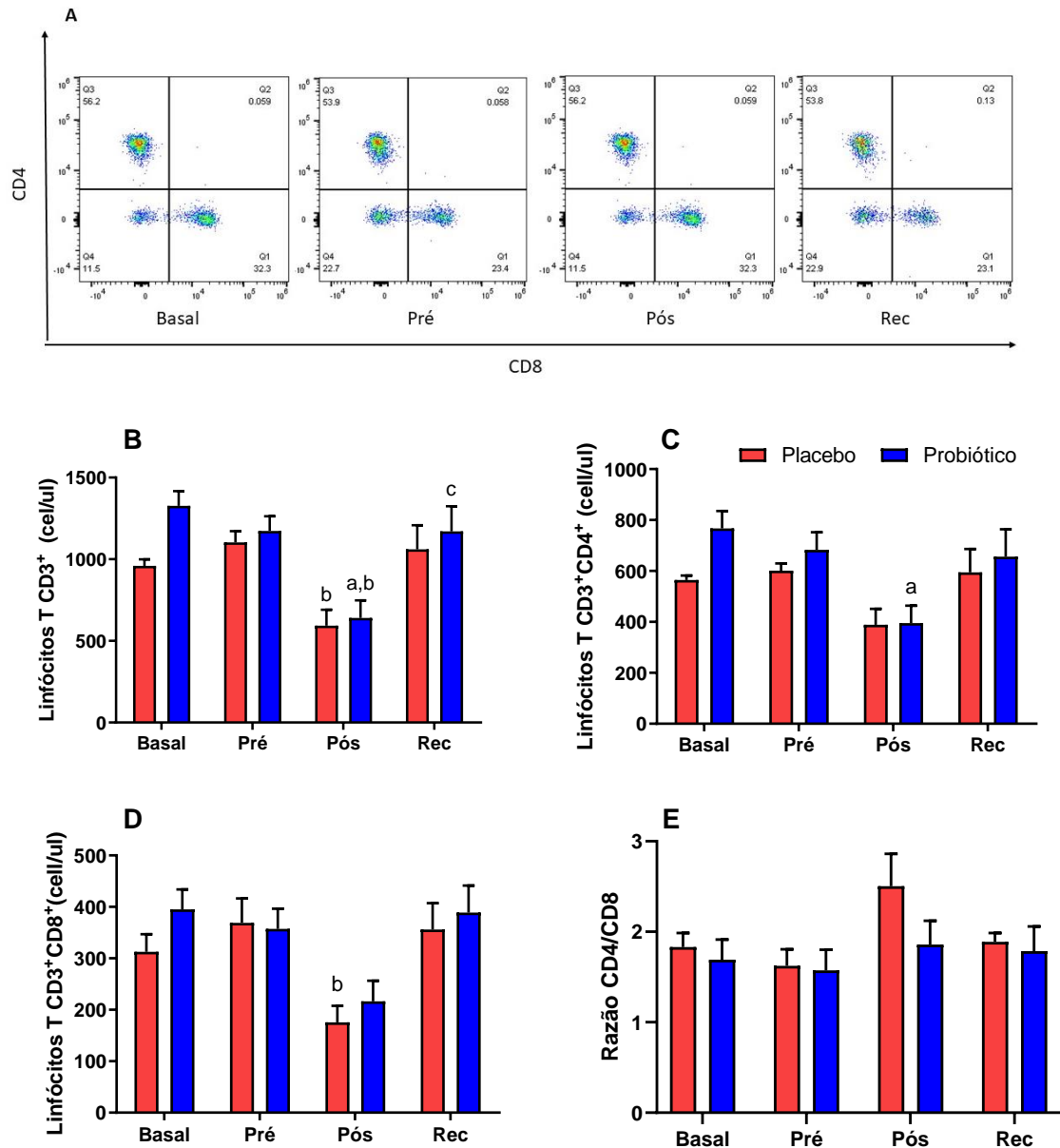


Figura 8. População de linfócitos: Representação gráfica da porcentagem dos linfócitos T (A) Numero total de Linfócitos T CD3 (B), CD4 (C), CD8 (D), e razão CD/CD8 (E); do sangue dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=14) e probiótico (barra azul n=13); nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com Basal. ^b p<0,05 comparando com Pré. ^c p<0,05 comparando com Pós. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.5. Linfócitos T duplo-negativos

Houve uma cinética interessante em relação as células negativas para CD4 e CD8 ($CD3^+ CD4^- CD8^-$). Essa população aumentou no momento pré, em comparação com o basal, independente da suplementação, sugerindo uma resposta ao treinamento físico. Entretanto, após a maratona essas células voltam próximas aos valores basais e aumentam novamente no período de recuperação (Figura 9A). Apesar de não haver diferença entre os grupos, observamos uma correlação negativa entre a proporção dessas células e a idade dos atletas (Figura 9B).

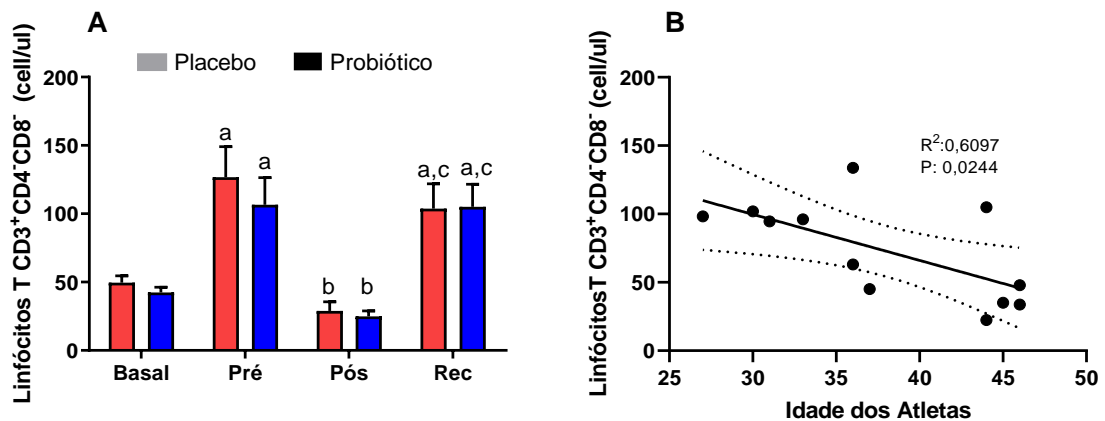


Figura 9. Linfócitos duplo-negativos: Número total de Linfócitos T $CD3^+CD4^-CD8^-$ (A) do sangue dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha $n=14$) e probiótico (barra azul $n=13$); nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). Correlação entre os linfócitos T $CD3^+CD4^-CD8^-$ circulantes e a idade dos atletas no momento basal (B). ^a $p<0,05$ comparando com Basal. ^b $p<0,05$ comparando com Pré. ^c $p<0,05$ comparando com Pós. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

Nós especulamos que essas células poderiam ser as células MAIT ou células T gamma-delta (olhar discussão). Então analisamos a expressão gênica do fator de transcrição *promyelocytic leukemia zinc finger protein* (PLZF) essencial para o desenvolvimento de ambas as células; e de ROR γ t, altamente expresso nas duas populações. Apesar de não estatístico, tanto PLZF quanto ROR γ t seguiram o mesmo padrão das células duplo-negativas; diminuindo em resposta a maratona e aumentando 5 dias após (Figura 10)

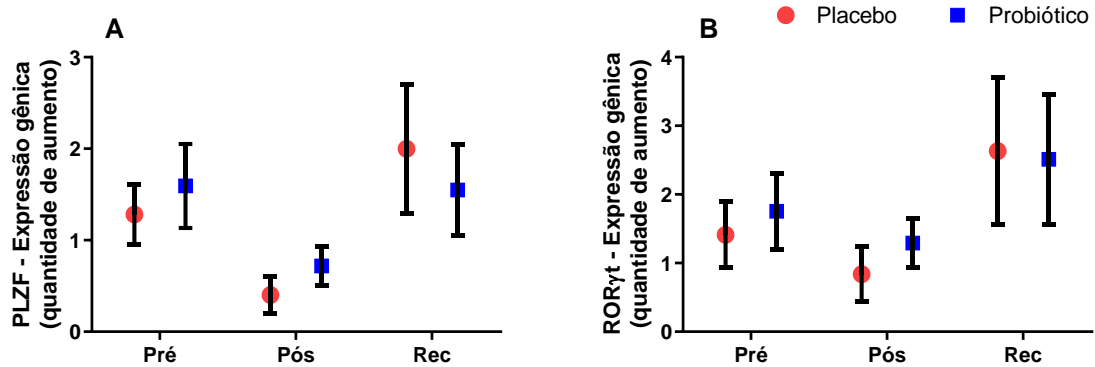


Figura 10. Expressão gênica dos fatores de transcrição PLZF (A), e ROR γ t (B). De linfócitos isolados do sangue dos atletas dos grupos placebo (círculo vermelho N=6) e probiótico (quadrado azul N=6); nos momentos Pré, Pós e Recuperação (Rec). (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.6. Subpopulação de memória dos linfócitos T

Para avaliar se a maratona e/ou a suplementação com probióticos alteraram a os linfócitos de memória circulares, essas células foram marcadas com CD45Ra e CD27. Essa análise não foi realizada no momento basal. Quando avaliamos as subpopulações dos linfócitos T CD8 (Figura 11), observamos que as células de memória central (CM), as células de memória efetoras (EM) (CD45Ra⁻CD27⁻) e as células efetoras de memória RA (EMRA) (CD45Ra⁺CD27⁻) diminuíram estatisticamente apenas no grupo placebo em resposta a maratona (momento pós comparado com o pré). Apesar do grupo probiótico apresentar duas vezes o número de células Naïve em relação ao grupo placebo após a corrida, os valores não foram estatísticos. Para a subpopulação de TCD4, o grupo probióticos apresentou uma tendência em aumentar as células de fenótipo EMRA (P=0,06), não havendo diferença para os outros subtipos (Figura 12).

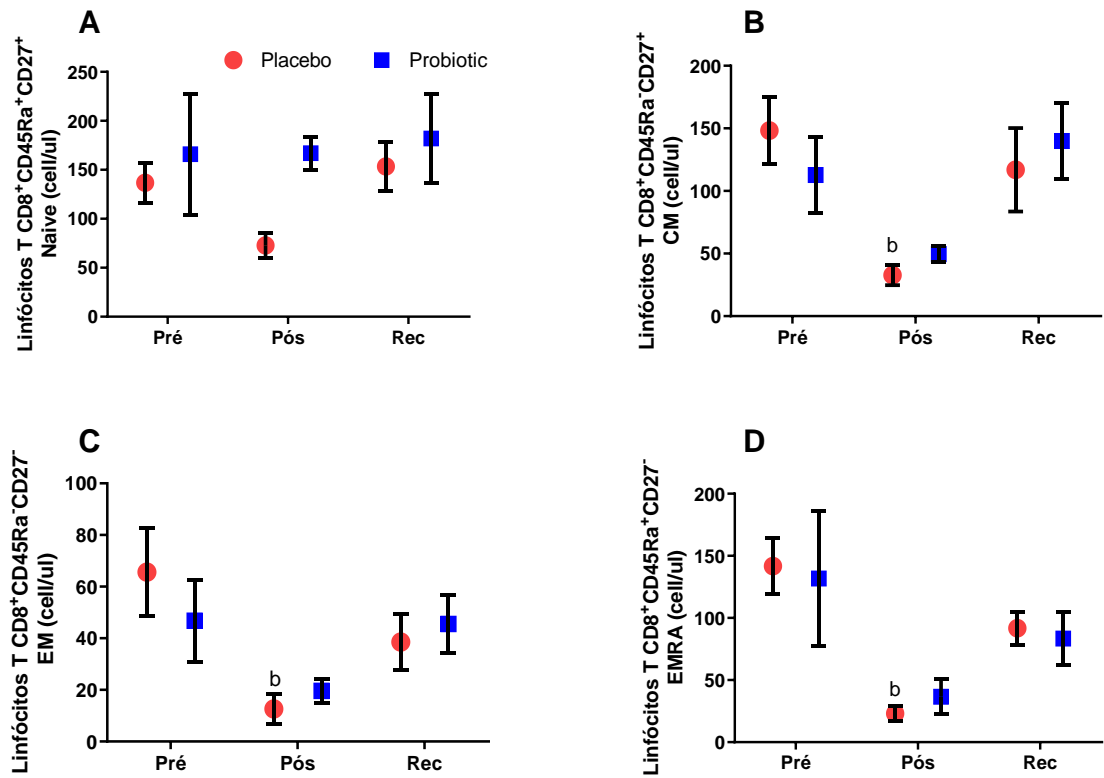


Figura 11. Valor absoluto dos subtipos de memória dos linfócitos T CD8, Naïve (A) de memória central (CM) (B) memória efetora (EM) (C) memória efetora RA (EMRA) (D). Do sangue dos atletas dos grupos placebo (círculo vermelho N=6) e probiótico (quadrado azul N=6); nos momentos Pré, Pós e Recuperação. ^b P<0,05 comparando com pré (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

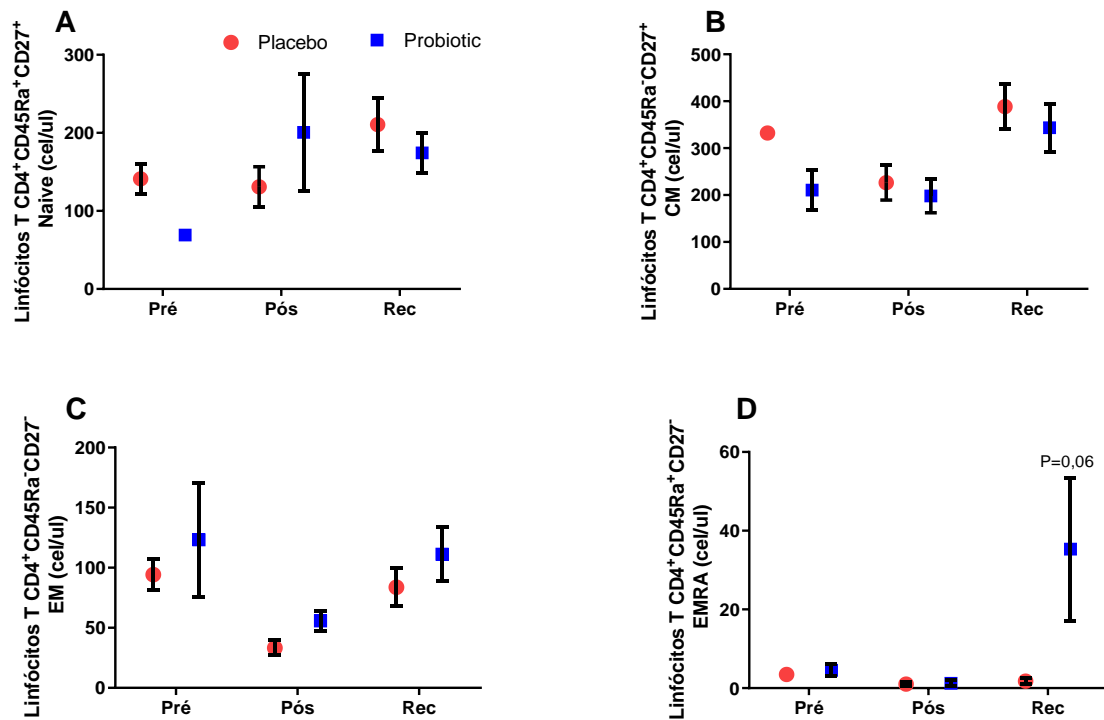


Figura 12. Valor absoluto dos subtipos de memória dos linfócitos T CD4, Naïve (A) de memória central (CM) (B) memória efetora (EM) (C) memória efetora RA (EMRA) (D). Do sangue dos atletas dos grupos placebo (círculo vermelho N=6) e probiótico (quadrado azul N=6); nos momentos Pré, Pós e Recuperação. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.7. Produção de citocinas pelos linfócitos sob estímulo

Os linfócitos dos maratonistas foram isolados, plaqueados e estimulados por 24h com PMA. A produção de citocinas no meio de cultura foi avaliada por multiplex. No momento basal, os atletas do grupo probiótico apresentaram uma produção aumentada das citocinas pró inflamatórias IFN γ (figura 13), TNF α (figura 14), IL-1 β (figura 15) e IL-6 (figura 16). Após o período de suplementação, momento pré, a concentração dessas citocinas diminuiu de maneira significativa. IL-10 (figura 17), IL-4 (figura 19) e IL-15 (figura 20) não foram alteradas em nenhum momento para nenhum dos grupos. IL-2 diminuiu estatisticamente pós prova quando comparada com o momento basal para o grupo probiótico (Figura 18). IL-8 aumentou em ambos os grupos em resposta a maratona (momento pós quando comparado com pré) e diminuiu apenas no grupo placebo 5 dias após (momento rec) (figura 21).

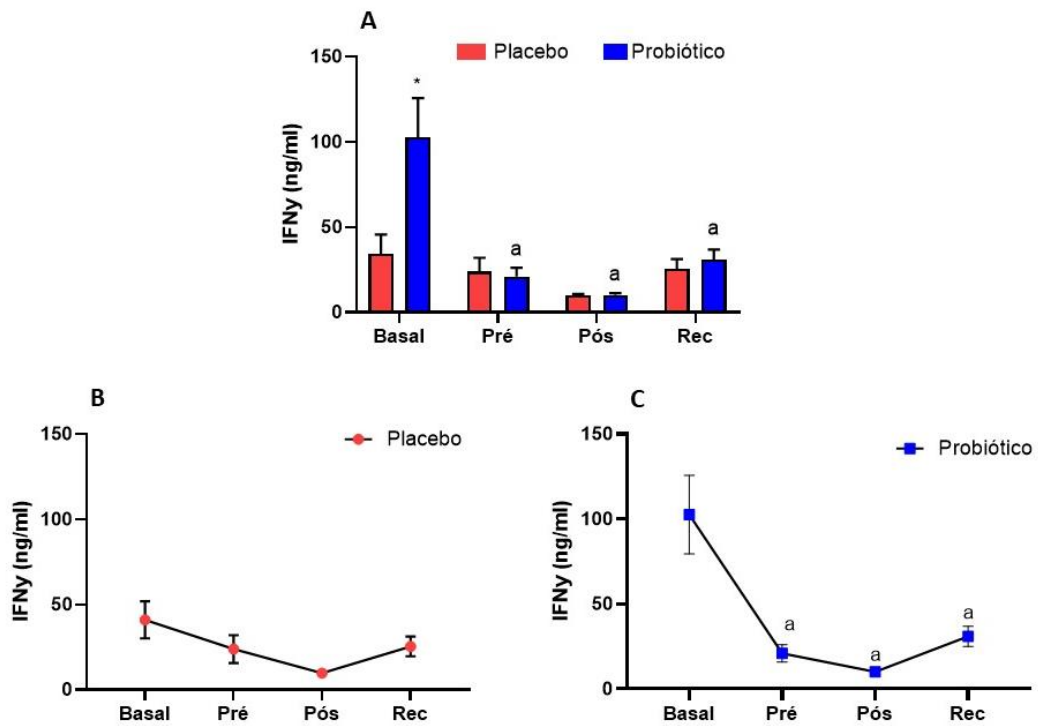


Figura 13. IFN γ produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=8) e probiótico (barra azul n=8); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. * p<0,05 comparando entre grupos (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

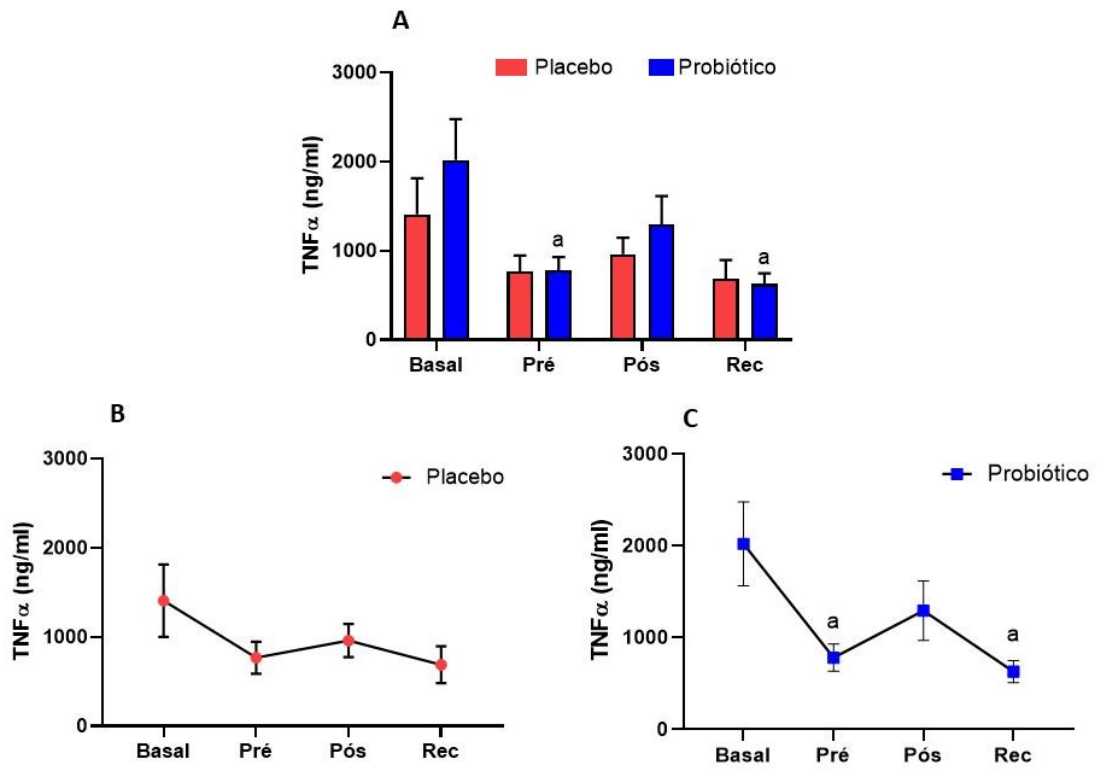


Figura 14. TNF α produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

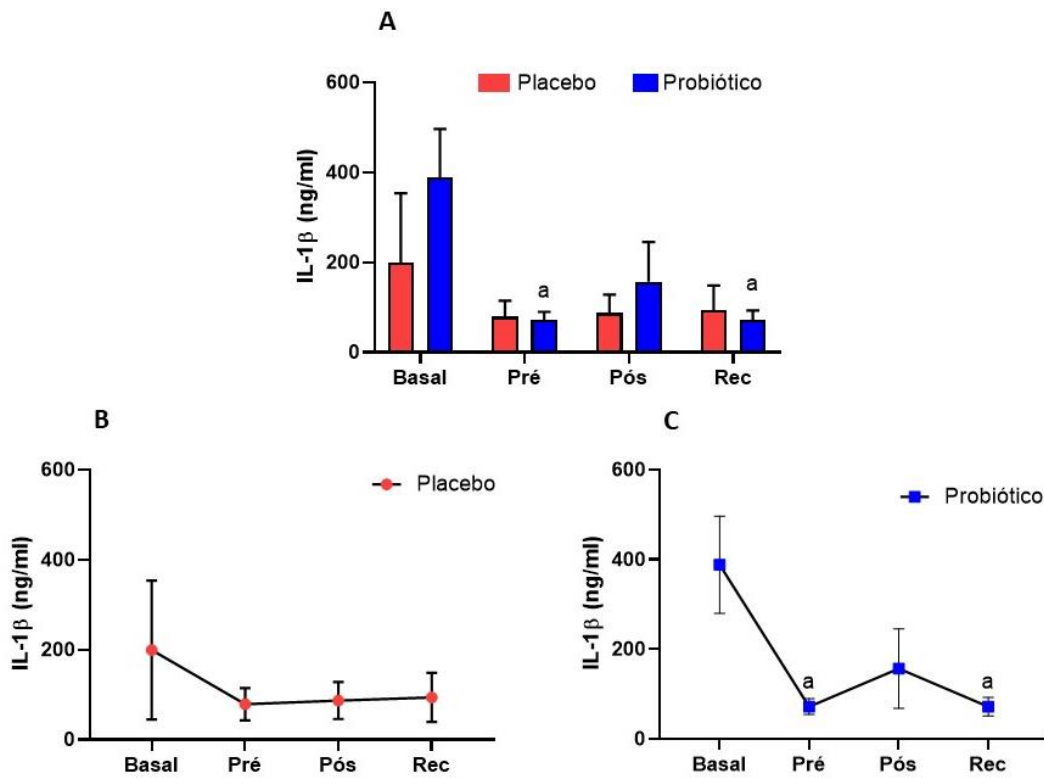


Figura 15. IL-1 β produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

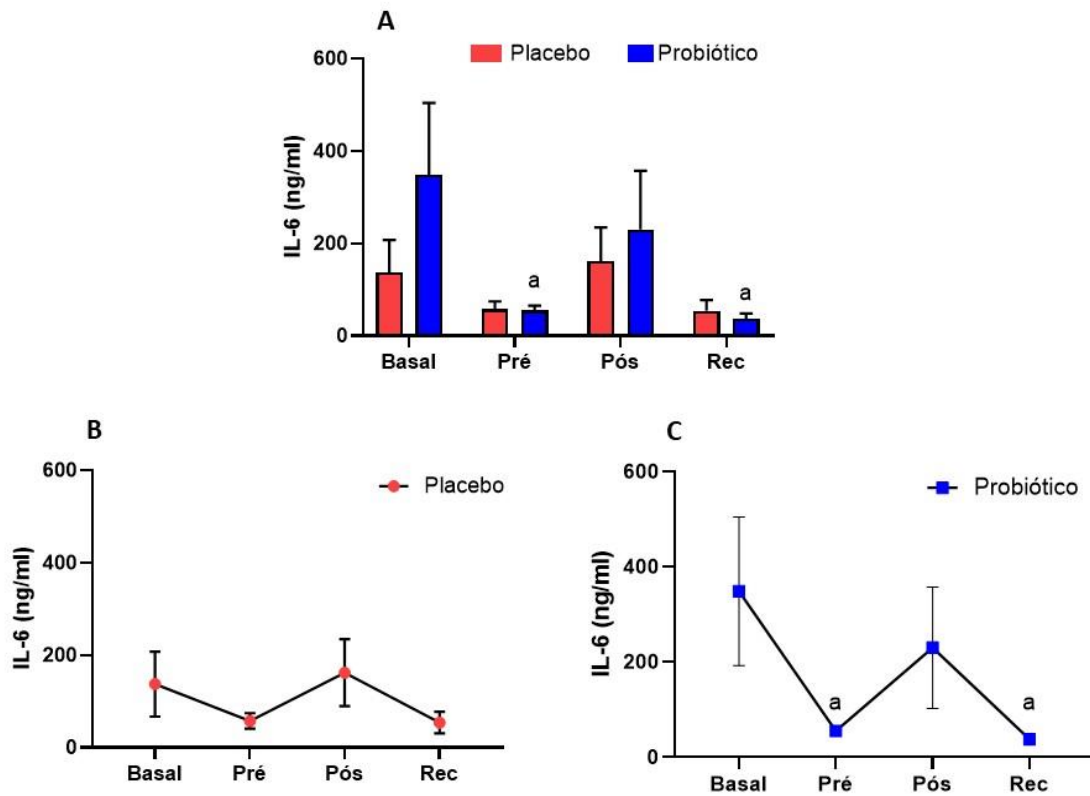


Figura 16. IL-6 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a p<0,05 comparando com basal. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

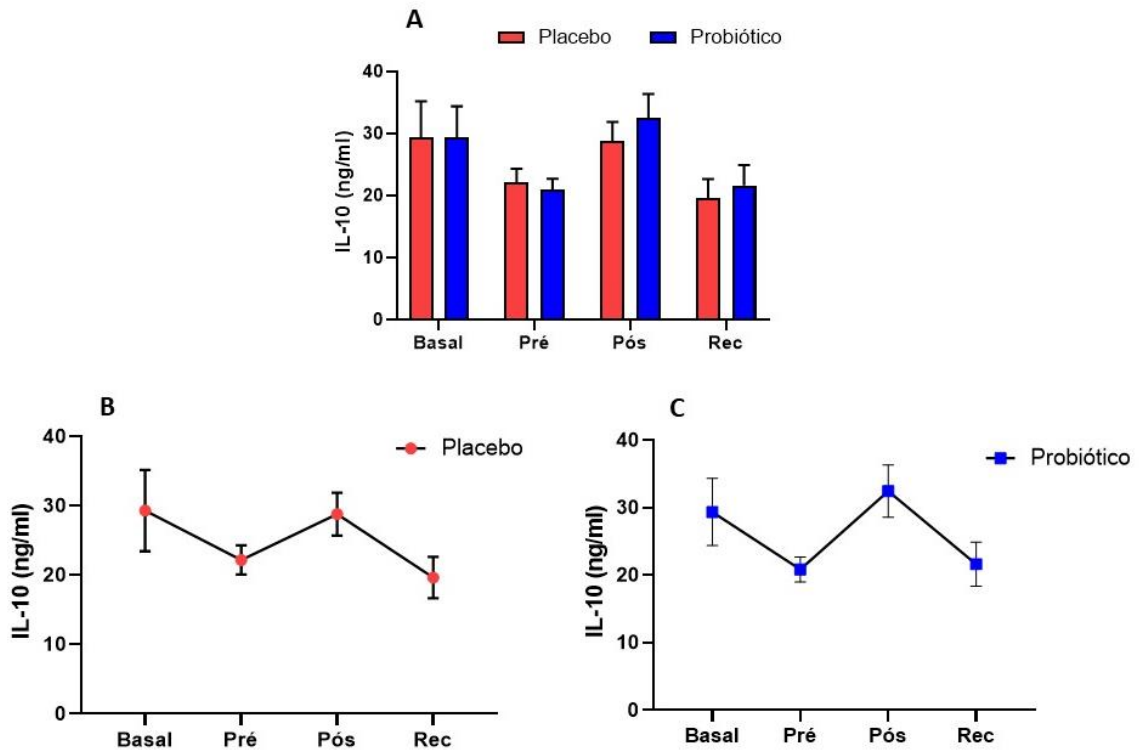


Figura 17. IL-10 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

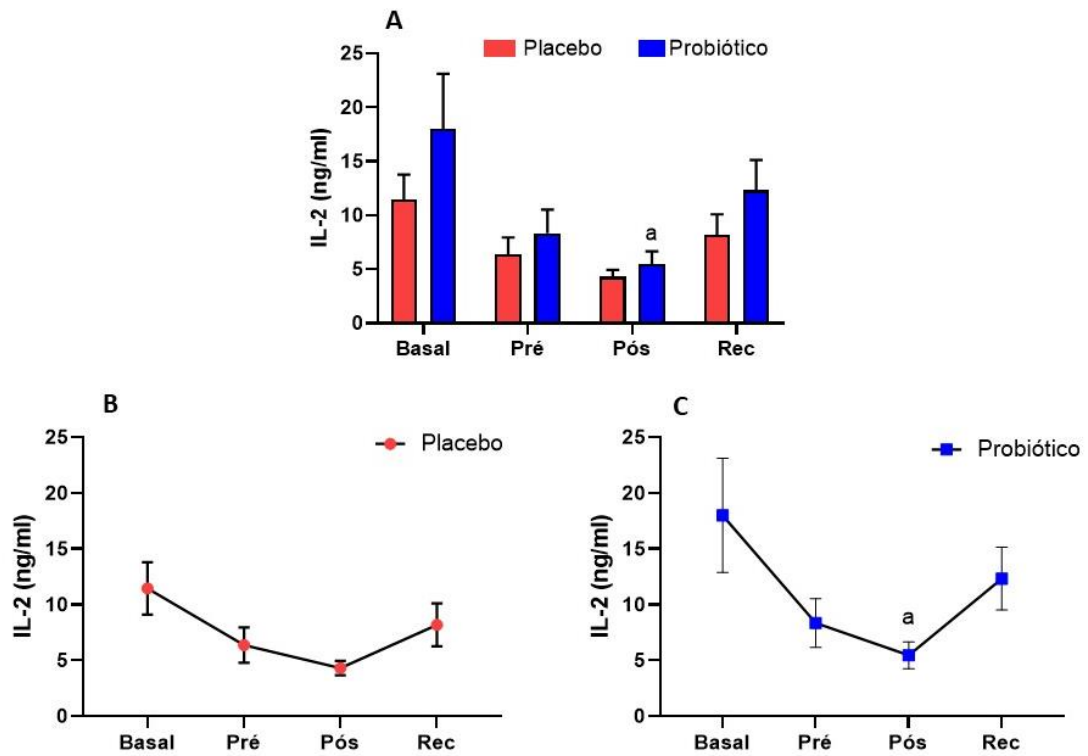


Figura 18. IL-2 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^a $p < 0,05$ comparando com basal. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

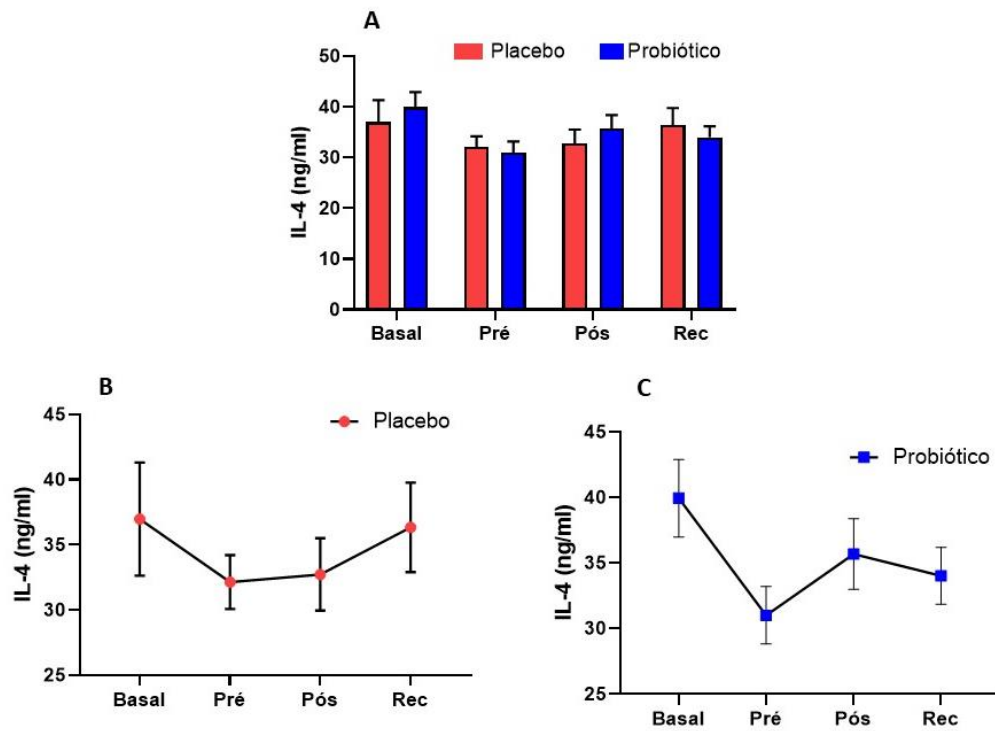


Figura 19. IL-4 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

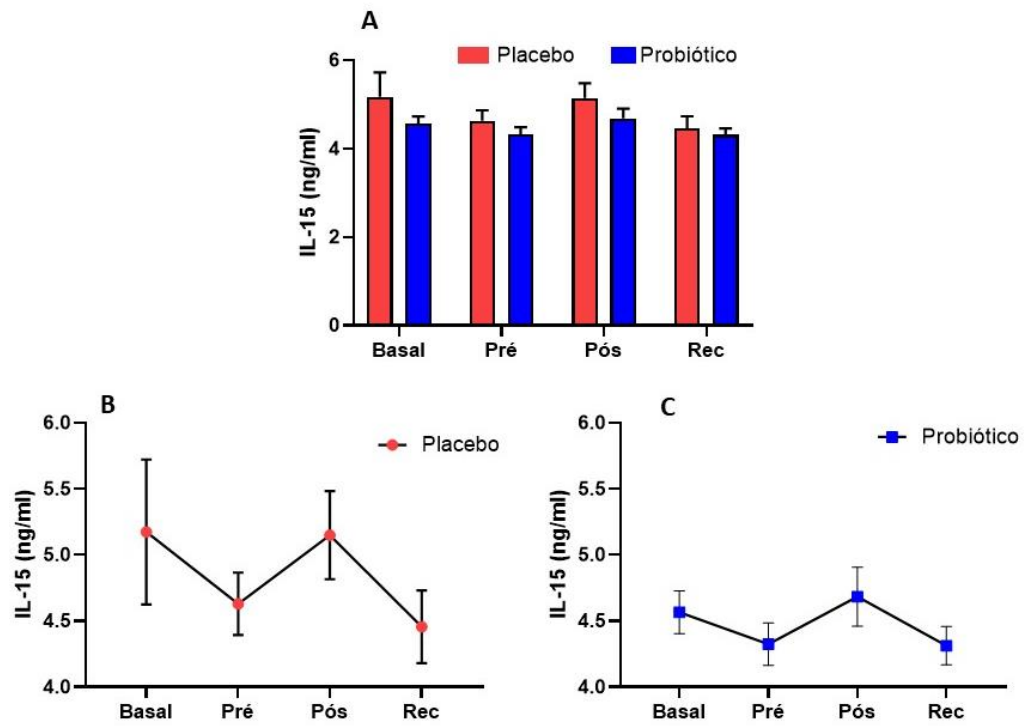


Figura 20. IL-15 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

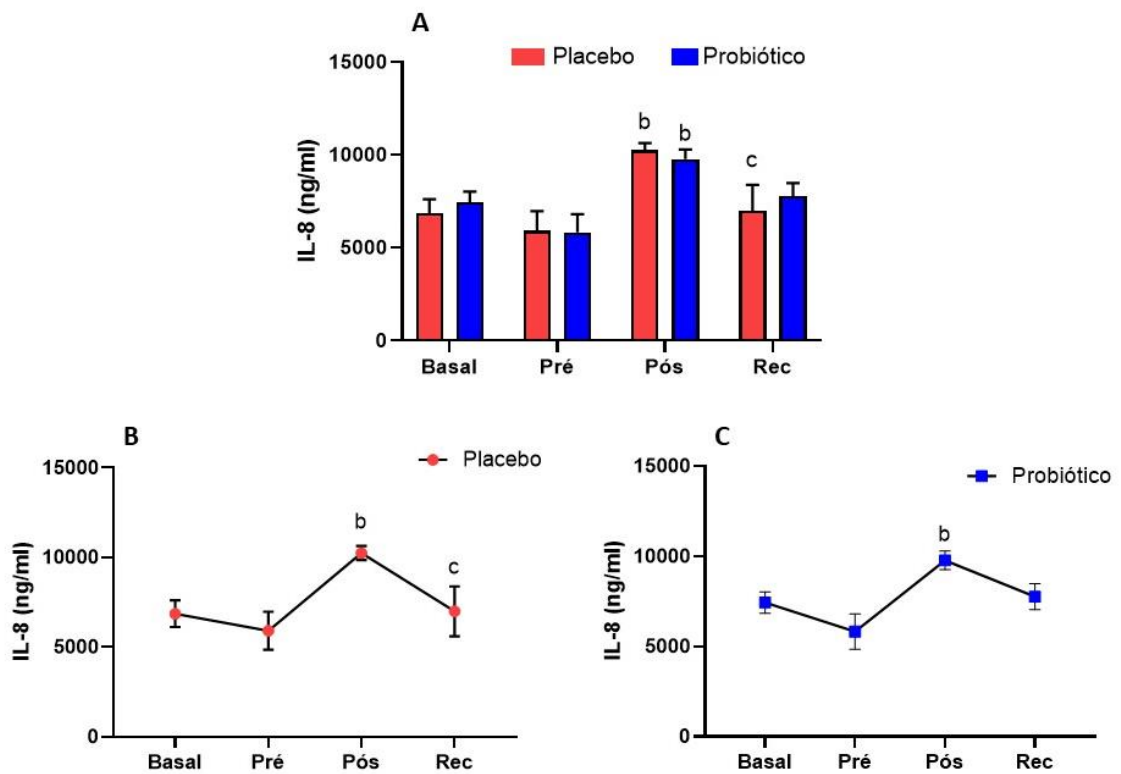


Figura 21. IL-8 produzido por linfócitos estimulados dos atletas dos grupos placebo (barra vermelha n=10) e probiótico (barra azul n=10); representação gráfica dos grupos isolados (B) placebo, (C) probiótico; nos momentos Basal, Pré, Pós e Recuperação (Rec). ^b $p < 0,05$ comparando com Pré; ^c $p < 0,05$ comparando com Pós. (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.8. Expressão gênica dos marcadores inflamatórios

A expressão gênica do fator de transcrição NFκB e do receptor de membrana TLR-4 foi avaliada nos linfócitos estimulados nos momentos pré, pós e recuperação. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos e os momentos; entretanto, o grupo placebo apresentou uma tendência em diminuir NFκB após a prova e aumentar TLR-4 na recuperação em relação ao grupo probiótico (figura 22)

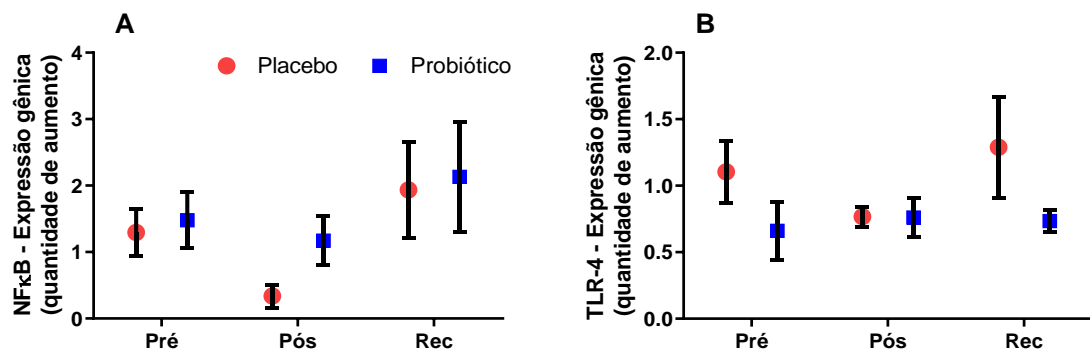


Figura 22. Expressão gênica dos mediadores inflamatórios NFκB (A), e TLR-4 (B). De linfócitos isolados do sangue dos atletas dos grupos placebo (círculo vermelho N=6) e probiótico (quadrado azul N=6); nos momentos Pré, Pós e Recuperação (Rec). (Anova two-way medidas repetidas, seguido por turkey)

6.9. Infecção do trato respiratório superior

Para avaliarmos se a suplementação de probióticos foi capaz de diminuir os sintomas e a severidade dos sintomas de infecção do trato respiratório superior, foi aplicado um questionário por 10 dias consecutivos. Inicialmente, avaliamos os atletas que apresentavam ou não sintomas de infecção (Figura 23A). Em seguida avaliamos a severidade dos sintomas quando apresentados (Figura 23B). O grau de severidade variava de 1 a 5, sendo 1 severidade branda e 5 severidade mais acentuada. Ao final avaliamos a presença de infecção do trato respiratório superior nesses atletas (Figura 23C). Consideramos que o atleta apresentou infecção quando relatou 3 ou mais sintomas por 3 ou mais dias. Em Nenhuma das análises verificamos uma diferença estatística entre o grupo Probiótico e o grupo placebo. Verificamos também que quando apresentados, os sintomas eram de severidade branda.

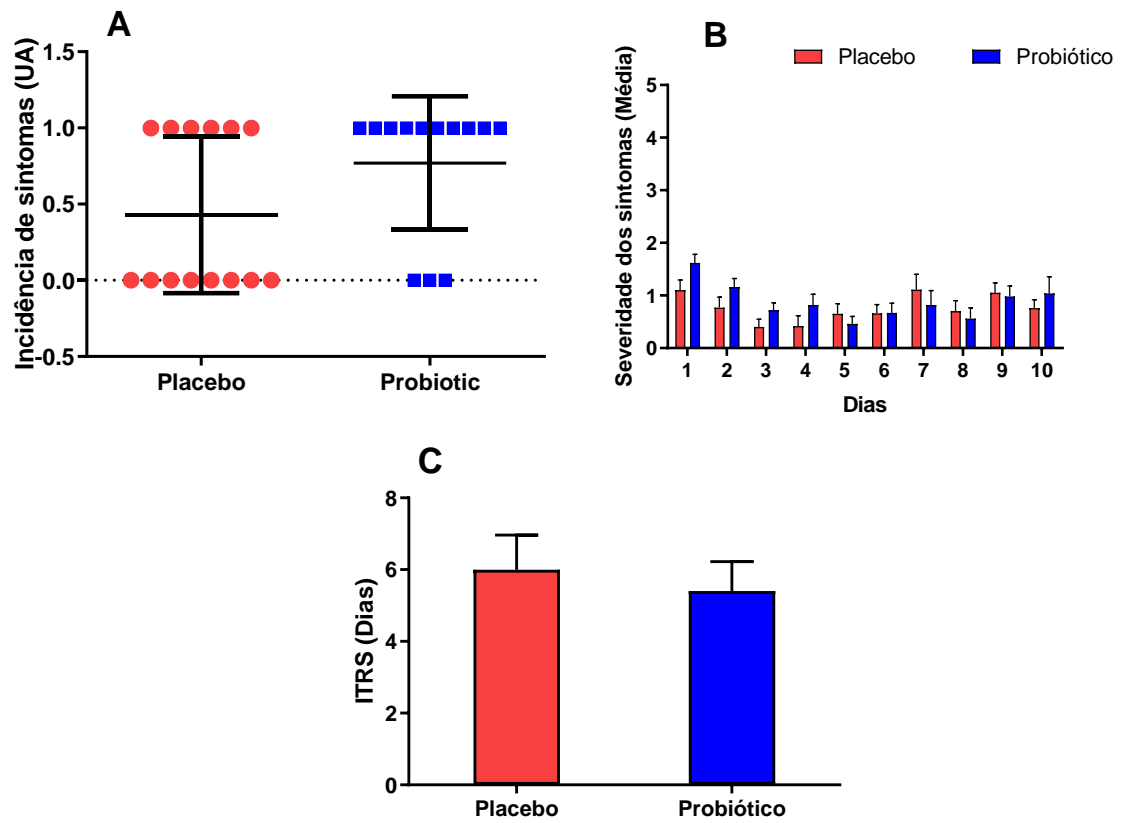


Figura 23. ITRS. Incidência dos sintomas (A), Severidade dos sintomas (B), manifestação de infecção do trato respiratório superior (C), nos atletas do grupo Placebo (barra vermelha N=14) e probiótico (barra azul N=13) do dia 1 ao dia 10 após a realização da maratona. (Anova two-way de medidas repetidas, seguido por Bonferroni)

7. DISCUSSÃO

O exercício físico prolongado de alta intensidade é conhecido por promover uma leucocitose aguda e aumentar a concentração plasmática das citocinas IL-6 e IL-10. Os nossos resultados reproduziram essa resposta imunológica clássica e a suplementação de probióticos por 30 dias não alterou esses parâmetros. Entretanto, nós mostramos aqui uma cinética interessante na modulação das células T duplo-negativas ($CD3^+CD4^-CD8^-$) em resposta ao exercício físico. A quantidade e proporção dessas células aumentou no período de treinamento (momento pré comparado com basal), independente da suplementação de probióticos; sofreu uma queda em resposta a maratona (momento pós) e foi aumentou novamente 5 dias após (Recuperação). Essa população de linfócitos começou a ser investigada recentemente e ainda há pouca literatura na área de imunologia do exercício. Como discutiremos abaixo, especulamos que essas células sejam, dois importantes subtipos de linfócitos T que atuam na imunidade de mucosas. Nós encontramos também que a suplementação de probióticos nos 30 dias antecedentes a maratona teve um efeito positivo na quantidade total das células T CD8 e nos seus subtipos de memória; e regulou a resposta dos linfócitos, em cultura, ao estímulo.

O aumento das células imunológicas circulantes em resposta ao exercício físico prolongado começou a ser descrito no final dos anos 80 pelo grupo do professor Davidson (DAVIDSON et al., 1987). Um tempo depois, foi observado que essa resposta era decorrente da ação das catecolaminas; e que as células tendiam a voltar para os valores de repouso de 6-24h após o término do exercício (dependendo da duração e intensidade da sessão) (PEDERSEN; TOFT, 2000) . Os neutrófilos são os maiores responsáveis por esse aumento, os monócitos possuem uma pequena contribuição (BIGLEY et al., 2014) . Os linfócitos aumentam de maneira considerável em quantidade e proporção, com uma participação importante das células NK, durante o exercício físico e egressam da circulação minutos após o término do estímulo (PEAKE et al., 2017). É comum que após exercícios de duração e intensidade altos ocorra uma linfopenia transitória, podendo durar até 6 horas (SIMPSON et al., 2015). Nos nossos resultados nós observamos que uma hora após a maratona os atletas apresentaram uma redução no número total e porcentagem dos linfócitos circulantes.

A concentração de citocinas no soro também é alterada em resposta ao exercício aeróbio. IL-6 é drasticamente aumentada; e, apesar de ser classicamente

descrita como pró-inflamatória, quando produzida e liberada durante o exercício físico ela tem conhecidas funções anti-inflamatórias e terapêuticas. O músculo é o grande responsável por sua produção, devido as contrações musculares. Essa IL-6 produzida pelo músculo, induz linfócitos a produzirem IL-10 e IL-1Ra (PETERSEN; PEDERSEN, 2006, p. 6) , duas importantes citocinas pró-inflamatórias. Nossos resultados reproduziram esses dados, já que a concentração plasmática de IL-6 e IL-10 aumentaram no momento pós, para ambos os grupos, independente do estímulo com LPS.

Para caracterizar as populações de linfócitos foi realizada uma imunofenotipagem no sangue total (como descrito nos métodos). O número de linfócitos T CD3, para ambos os grupos, e CD8, para o grupo placebo, seguiu o mesmo padrão dos linfócitos totais diminuindo em resposta a maratona. Tossige-Gomes e colaboradores (2014) não encontraram nenhuma alteração na contagem total de Linfócitos T *helper* (Th) (CD3⁺CD4⁺) ou T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺) em resposta ao exercício exaustivo (TOSSIGE-GOMES et al., 2014) . Entretanto, alguns estudos mostram que exercícios prolongados de alta intensidade diminuem a porcentagem de CD8, sem alterar o número total de células (ZHENG; CHEN; ZHOU, 2018) .

Os linfócitos CD8⁺ são os principais responsáveis por combater infecções virais e células tumorais, eles agem inativando células infectadas e defeituosas prevenindo sua proliferação (O'ROURKE; MESCHER, 1993). Em pacientes com HIV e hepatite C a função e a proliferação dos linfócitos citotóxicos é suprimida (GONZALEZ; TABORDA; RUGELES, 2017; GRUENER et al., 2001) indicando que a redução no número e na atividade dessa célula seria um contribuinte importante também para infecções oportunistas. Como descrito acima, nos resultados, o grupo suplementado com probióticos não apresentou uma queda significativa de linfócitos TCD8 após a corrida de maratona.

Dentre as subpopulações de linfócitos T CD8, observamos que o número total de EM, EMRA e CM diminuiu após a maratona, estatístico apenas para o grupo placebo, e retornou aos valores próximos do momento basal, na recuperação (5 dias após a prova). Spielmann e colaboradores (2014) descobriram que 30 min de ciclismo a 80% foi capaz de mobilizar células CD8 Naïve, com mais eficiência em indivíduos mais jovens comparados com idosos (SPIELMANN et al., 2014). O exercício físico também foi capaz de aumentar o subtipo altamente diferenciados EMRA. Em outro

estudo do mesmo grupo (KUNZ et al., 2018), um protocolo similar de exercício físico aumentou os subtipos de EM e EMRA nos linfócitos CD4 e CD8, mantendo essa diferença de pré e pós-exercício por 8 dias após expansão celular *ex-vivo*. Esse exercício intenso a curto prazo também aumentou a mobilização de células T específicas para vírus, melhorando o sucesso da imunoterapia para infecções virais (KUNZ et al., 2018). A diferenciação do linfócito para um subtipo efetor, aumenta a capacidade citotóxica e ou de produção de citocinas, aumentando a eficácia contra patógenos (KUNZ et al., 2018). Isso posto, uma redução nos subtipos de EM EMRA e CM induzido pela maratona, pode aumentar a suscetibilidade à infecção viral.

Os linfócitos Th, por sua vez, produzem citocinas que ativam macrófagos, linfócitos B e linfócitos citotóxicos, modulando a resposta imunológica tanto de caráter Th1 (IFN γ , TNF α , IL-1) quanto Th2 (IL-4, IL-10) (DEL GIACCO et al., 2014; RADOM-AIZIK et al., 2007), bem como diminuição na proliferação dos linfócito em resposta ao exercício físico extenuante. Nos nossos resultados encontramos que no momento basal (antes de qualquer intervenção) Os linfócitos os atletas do grupo probiótico, quando estimulados com PMA, apresentaram uma produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias. Essa resposta foi atenuada no momento pré-prova (após 30 dias de suplementação), sugerindo que a suplementação com probióticos foi capaz de modular a resposta dos linfócitos ao estímulo.

A relação CD4/CD8 é utilizada como base para o diagnóstico de algumas doenças imunológicas, como HIV (CABY; WRITING COMMITTEE OF THE CD4+/CD8+ RATIO WORKING GROUP OF THE FRENCH HOSPITAL DATABASE ON HIV (FHDH-ANRS CO4), 2017). Índices menores do que 1 são frequentemente encontrados em pacientes imunossuprimidos (MCBRIDE; STRIKER, 2017) e alguns trabalhos demonstraram que atletas de elite apresentavam essa relação alterada logo após a competição, retornando aos níveis basais no período de recuperação (BROWN et al., 2015; LEE et al., 2012). Nós não observamos diferença entre os momentos nem entre os grupos, e os valores se mantiveram superiores a 1 em todos os tempos de coleta, indicando que apesar dos valores de CD8 serem reduzidos a relação CD4/CD8 foi mantida.

Uma população que sofreu bastante alteração pela maratona e chamou muita atenção foi a dos linfócitos CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (duplo negativo). Essa classe de linfócitos não clássicos tem despertado muito interesse, nos últimos anos, por ser uma população representativa, tanto circulante, quanto nos tecidos, que possui alta

responsividade contra infecções virais e bacterianas. Uma das primeiras a serem descritas foram as células *invariant natural Killer T* (iNKT) que reconhecem os antígenos a partir da molécula CD1d presente na superfície das células apresentadoras de antígenos (TARD; ROUXEL; LEHUEN, 2015) e quando ativadas produzem rapidamente grandes quantidades de IL-4 e INF- γ apresentando também efeitos citotóxicos (TOUCH; CLÉMENT; ANDRÉ, 2017). Outra população recentemente descrita foram as células *mucosal-associated invariant T* (MAIT).

As células MAIT quando ativadas produzem de maneira rápida e eficiente IFN γ , TNF- α , IL-17, e IL-22 (KURIOKA et al., 2015; MEIEROVICS; YANKELEVICH; COWLEY, 2013). Elas reconhecem diversos tipos de bactérias e estão diretamente relacionadas com a imunidade antimicrobiana, uma vez que são ausentes em animais germ-free (TREINER et al., 2003). Neste contexto os probióticos poderiam ter uma importante modulação nessa população, já que fortalecem a flora intestinal. Porém, nos nossos resultados não observamos diferenças entre o grupo probióticos e o grupo placebo no que diz respeito a quantidade das células dupla negativas

Dados da literatura mostram ainda que as células MAIT possuem uma participação importante na imunidade de mucosas, principalmente prevenindo infecções aéreas (HINKS, 2016) e a concentração circulante dessa população está reduzida em pacientes com doenças infecciosas e doenças inflamatórias intestinais (HIEJIMA et al., 2015; SALOU; FRANCISZKIEWICZ; LANTZ, 2017). Nós observamos uma queda significativa na concentração desses linfócitos não clássicos após a prova de maratona, esse pode ser um mecanismo adicional pelo qual os atletas apresentam uma susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de infecções oportunistas.

Um outro grupo células que apresenta a característica duplo-negativa, são os linfócitos T gamma-delta. Essas células possuem característica de células citotóxicas efectoras, reconhecendo e respondendo rapidamente a uma variedade de patógenos, removendo infecções bacterianas e erradicando células tumorais (BRAZA; KLEIN, 2013; GIRARDI, 2006) . As células Gamma-delta são sensíveis a estímulos de estresse e respondem muito bem ao exercício agudo. Durante o exercício intenso de curta duração, elas aumentam drasticamente na circulação e retornam a níveis de repouso minutos após o término da sessão (ANANE et al., 2010). Além do mais, esse grupo de linfócitos também é modulado pelo treinamento crônico. Jogadoras de futebol apresentam uma proporção aumentada de células T $\gamma\delta$, em repouso, quando comparado com indivíduos não treinados (BROWN et al., 2015).

A suplementação com probióticos parece não alterar essas células duplo-negativas, uma vez que não há diferença entre os grupos em nenhum dos momentos. Entretanto esse subtipo de linfócitos apresenta uma resposta interessante ao exercício físico. Nós encontramos que a proporção e a quantidade total de linfócitos T $CD3^+CD4^-CD8^-$ aumentam no momento pré-prova em comparação com o momento basal. Esse período corresponde a um regime de treino intenso e volumoso, o que indica que exercício físico crônico de longa duração pode modular esse subtipo celular. Além do mais, no momento pós maratona observamos uma queda nessa população de células (onde os valores são similares com o momento basal). Esse resultado sugere que tanto o exercício crônico, quanto o exercício agudo podem modular esse subtipo de linfócitos.

Para entender melhor essa população celular nós verificamos a expressão genica de PLZF e ROR γ t. PLZF é um fator de transcrição altamente expresso e essencial para o desenvolvimento e para função efetora de células T MAIT e T $\gamma\delta$ (BONNEVILLE; O'BRIEN; BORN, 2010; KOAY et al., 2016) ; pacientes com vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), um retrovírus humano que causa severas infecções, apresentam expressão reduzida de PLZF (PAQUIN-PROULX et al., 2017). ROR γ t, normalmente conhecido por promover a diferenciação dos linfócitos Th17, é também altamente expresso pelas células MAIT e T $\gamma\delta$, e é responsável pela produção de IL-17 nesses grupos celulares. Apesar de não atingir diferença estatística, a expressão genica de PLZF e ROR γ t apresentaram um padrão muito similar ao dos linfócitos T $CD3^+CD4^-CD8^-$, diminuindo em resposta a maratona e aumentando na recuperação.

Isso posto, ambas as células MAIT (NOVAK et al., 2014) e T $\gamma\delta$ (PISTILLO et al., 2013), mas não as iNKT (CROUDACE et al., 2008) , apresentam uma correlação negativa com idade, estando reduzida em idosos. Nós encontramos essa correlação entre a quantidade de linfócitos T duplo-negativos no momento basal e a idade dos atletas (figura); o que é um forte indício de que essas células sejam MAIT e T $\gamma\delta$, com uma contribuição maior das gama-delta, já que o exercício físico teve um papel fundamental na modulação desse grupo celular.

Um dos objetivos do nosso estudo era entender se a suplementação de probióticos por 30 dias conferiria algum fator protetor contra a incidência de infecções oportunistas no período após a maratona. Para isso um questionário foi aplicado do

dia zero (dia da prova) até o dia 10 após a maratona. Tanto o grupo probiótico, quanto o grupo placebo apresentaram uma baixa quantidade de sintomas relacionados a ITRS durante esse período; e não houve diferença significativa entre os grupos em relação a severidade e a incidência dos sintomas. Em estudos prévios, a hipótese da “janela aberta” foi bastante discutida (PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 1995). Esse conceito aborda que até 72 horas após um exercício intenso e prolongado as células imunológicas apresentam uma função reduzida, o que aumentaria a suscetibilidade de infecções oportunistas. Especulava-se ainda que essa imunossupressão transitória era decorrente da na concentração plasmática de substratos energéticos, e por consequência na disponibilidade de substratos para as células imunológicas, já que esse quadro é parcialmente revertido pela suplementação aguda de glicose e glutamina (BATATINHA et al., 2019) .

Na última década, entretanto, as pesquisas têm associado a incidência de ITRS com repetidas sessões de exercício extenuante sem uma recuperação apropriada (descanso e nutrição) o que pode levar a um quadro de overtraining e a uma imunossupressão crônica (BATATINHA et al., 2019; CAMPBELL; TURNER, 2019; SIMPSON et al., 2020; TIERNAN et al., 2019) . Nesse aspecto uma suplementação crônica de específicos substratos parece ser uma estratégia mais efetiva. No nosso modelo nós não avaliamos a presença de sintomas antes da corrida. É possível que a baixa quantidade de sintomas relacionados a ITRS apresentados durante os 10 dias após a maratona, já estavam presentes antes mesmo da prova, em decorrência do volume e intensidade dos treinos.

Além do mais, o período de suplementação, 30 dias antes da maratona, pode ter sido um fator limitante do nosso estudo, e possa ter mitigado alguns possíveis benefícios. West e seus colaboradores (2014) utilizaram o mesmo mix de probióticos proposto neste trabalho, em uma dose reduzida (1×10^{10}), porém por um período prolongado (150 dias). Eles suplementaram indivíduos fisicamente ativos (não atletas) e verificaram que o grupo probiótico apresentou uma redução de 27% no risco de ITRS e tiveram menos ausências aos treinos (WEST et al., 2014a). Um outro estudo do mesmo grupo, com mesma dose de suplementação (1×10^{10}), pelo mesmo período (150 dias) mostrou que o probiótico foi capaz de diminuir MMP-1 circulante, uma enzima que degrada a matriz extracelular e está relacionada com o desenvolvimento de aterosclerose; mas não alterou a atividade de neutrófilos, monócitos e células NK (WEST et al., 2014b). Os autores sugerem que a suplementação com probiótico,

apesar de reduzir os riscos de ITRS, não teve efeito na atividade celular pois o grupo suplementado era imunocompetente; eles sugerem que os resultados podem ser diferentes se testado em outras populações, como crianças, idosos e atletas de endurance.

Ambos os estudos citados acima foram realizados em situação de repouso, ou seja, os efeitos de exercício agudo nas células do sistema imunológico e a interação dos probióticos nesse contexto não foram avaliados. No nosso estudo nós avaliamos 4 diferentes momentos: Antes e depois de 30 dias de suplementação (basal e pré), uma hora após a maratona (pós) e 5 dias após a realização da prova (recuperação). Nós encontramos que a suplementação com probióticos, em condições de repouso, modulou a resposta dos linfócitos ao estímulo; e, após o exercício intenso e prolongado, teve uma importante ação na população de linfócitos T CD8+.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, Apesar de não encontrarmos diferença em relação a incidência e sintomas relacionados com ITRS, 30 dias de suplementação com probióticos foi capaz de manter a população de linfócitos T CD8 e as subpopulações de memórias, após a maratona; e modulou a resposta dos linfócitos ao estímulo, sugerindo que os probióticos atuam no sistema imunológico de maratonistas. Além disso, nossos resultados abrem novas possibilidades de pesquisas no campo de imunologia do exercício, já que nós encontramos que tanto o treinamento quanto o exercício físico agudo intenso e prolongado são capazes de modular uma importante, e pouco estudada, população de linfócitos (linfócitos T CD3+CD4-CD8-).

As limitações desse estudo são o período de suplementação, não ter avaliado a presença de ITRS antes da maratona e não ter marcado a população de linfócitos T duplo-negativo para entender exatamente qual população é modulada.

Estudos com diferentes tempos de suplementação e composição de probióticos são necessários para que possamos entender melhor os efeitos dos probióticos no sistema imunológico e na saúde geral dos atletas. Além disso, outros estudos são necessários para identificar o papel dos linfócitos não clássicos em indivíduos treinados.

9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LINCHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- AGOSTINI, F.; BIOLO, G. Effect of physical activity on glutamine metabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 1, p. 58–64, jan. 2010.
- ALMEIDA, L. et al. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 514–524, out. 2016.
- ANANE, L. H. et al. Mobilization of gammadelta T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and beta-agonist infusion. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 6, p. 823–829, ago. 2009a.
- ANANE, L. H. et al. Mobilization of $\gamma\delta$ T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and β -agonist infusion. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 6, p. 823–829, 1 ago. 2009b.
- ANANE, L. H. et al. Phenotypic characterization of gammadelta T cells mobilized in response to acute psychological stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 4, p. 608–614, maio 2010.
- ANDERSON, R. C. et al. Lactobacillus plantarum MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. **BMC microbiology**, v. 10, p. 316, 9 dez. 2010.
- AVULA, C. P. et al. Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 91, n. 6, p. 2546–2552, dez. 2001.
- BAKER, F. L. et al. Systemic β -Adrenergic Receptor Activation Augments the ex vivo Expansion and Anti-Tumor Activity of V γ 9V δ 2 T-Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 3082, 2019.
- BARRETT, B. et al. The Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey is responsive, reliable, and valid. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 58, n. 6, p. 609–617, jun. 2005.
- BATATINHA, H. A. P. et al. Nutrients, immune system, and exercise: Where will it take us? **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 61, p. 151–156, 2019.
- BATATINHA, H. A. P.; ROSA NETO, J. C.; KRÜGER, K. Inflammatory features of obesity and smoke exposure and the immunologic effects of exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 25, p. 96–111, 2019.
- BERMON, S. et al. The microbiota: an exercise immunology perspective. **Exercise Immunology Review**, v. 21, p. 70–79, 2015.
- BIGLEY, A. B. et al. Acute exercise preferentially redeploys NK-cells with a highly-differentiated phenotype and augments cytotoxicity against lymphoma and multiple myeloma target cells. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 39, p. 160–171, jul. 2014.

BISHOP, N. C. et al. Lymphocyte responses to influenza and tetanus toxoid in vitro following intensive exercise and carbohydrate ingestion on consecutive days. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 99, n. 4, p. 1327–1335, out. 2005.

BONNEVILLE, M.; O'BRIEN, R. L.; BORN, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 10, n. 7, p. 467–478, jul. 2010.

BRAZA, M. S.; KLEIN, B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. **British Journal of Haematology**, v. 160, n. 2, p. 123–132, jan. 2013.

BRITTI, M. S. et al. Regulation of immune response at intestinal and peripheral sites by probiotics. **Biologia**, v. 61, n. 6, p. 735–740, 1 dez. 2006.

BROWN, F. F. et al. T-lymphocyte populations following a period of high volume training in female soccer players. **Physiology & Behavior**, v. 152, n. Pt A, p. 175–181, 1 dez. 2015.

CABY, F.; WRITING COMMITTEE OF THE CD4+/CD8+ RATIO WORKING GROUP OF THE FRENCH HOSPITAL DATABASE ON HIV (FHDH-ANRS CO4). CD4+/CD8+ ratio restoration in long-term treated HIV-1-infected individuals. **AIDS (London, England)**, v. 31, n. 12, p. 1685–1695, 31 2017.

CAMPBELL, J. P. et al. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 6, p. 767–775, ago. 2009.

CAMPBELL, J. P.; TURNER, J. E. There is limited existing evidence to support the common assumption that strenuous endurance exercise bouts impair immune competency. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 15, n. 2, p. 105–109, fev. 2019.

CARIO, E.; GERKEN, G.; PODOLSKY, D. K. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1359–1374, abr. 2007.

CARR, E. L. et al. Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 185, n. 2, p. 1037–1044, 15 jul. 2010.

CARVALHO-PEIXOTO, J.; ALVES, R. C.; CAMERON, L.-C. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonia increase during endurance field exercise. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 32, n. 6, p. 1186–1190, dez. 2007.

CASTELL, L. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 33, n. 5, p. 323–345, 2003.

CASTELL, L. M. et al. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 75, n. 1, p. 47–53, 1997.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, abr. 1987.

COUTO, M. et al. Exercise and airway injury in athletes. **Acta Medica Portuguesa**, v. 26, n. 1, p. 56–60, fev. 2013.

- COX, A. J. et al. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. **British Journal of Sports Medicine**, v. 44, n. 4, p. 222–226, mar. 2010.
- CROUDACE, J. E. et al. Identification of distinct human invariant natural killer T-cell response phenotypes to alpha-galactosylceramide. **BMC immunology**, v. 9, p. 71, 3 dez. 2008.
- CRUZAT, V. F.; ROGERO, M. M.; TIRAPEGUI, J. Effects of supplementation with free glutamine and the dipeptide alanyl-glutamine on parameters of muscle damage and inflammation in rats submitted to prolonged exercise. **Cell Biochemistry and Function**, v. 28, n. 1, p. 24–30, jan. 2010.
- CRUZAT, V. F.; TIRAPEGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 428–435, abr. 2009.
- DAVIDSON, R. J. et al. Hematological changes associated with marathon running. **International Journal of Sports Medicine**, v. 8, n. 1, p. 19–25, fev. 1987.
- DAVIDSON, S. R.; HOFFMAN-GOETZ, L. Freewheel running selectively prevents mouse CD4+ intestinal lymphocyte death produced after a bout of acute strenuous exercise. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, n. 2, p. 139–143, mar. 2006.
- DEL GIACCO, S. R. et al. Exercise training, lymphocyte subsets and their cytokines production: experience of an Italian professional football team and their impact on allergy. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 429248, 2014.
- DHABHAR, F. S. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 359–372, 1 maio 1998.
- DHABHAR, F. S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 300–317, 2009.
- DIMITROV, S.; LANGE, T.; BORN, J. Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 1, p. 503–511, 1 jan. 2010.
- DOS SANTOS, R. V. T. et al. Effect of exercise on glutamine synthesis and transport in skeletal muscle from rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 36, n. 8, p. 770–775, ago. 2009.
- DRELA, N.; KOZDRON, E.; SZCZYPIORSKI, P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. **BMC geriatrics**, v. 4, p. 8, 29 set. 2004.
- EDWARDS, J. P. et al. Anxiety and perceived psychological stress play an important role in the immune response after exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 24, p. 26–34, 2018.
- FIELDS, D. A.; GORAN, M. I. Body composition techniques and the four-compartment model in children. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 89, n. 2, p. 613–620, ago. 2000.
- FIELDS, D. A.; HUNTER, G. R.; GORAN, M. I. Validation of the BOD POD with hydrostatic weighing: influence of body clothing. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24, n. 2, p. 200–205, fev. 2000.
- FRENCH, D. N. et al. Anticipatory responses of catecholamines on muscle force production. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 102, n. 1, p. 94–102, jan. 2007.

- GABRIEL, H. H. et al. Overtraining and immune system: a prospective longitudinal study in endurance athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 7, p. 1151–1157, jul. 1998.
- GÁLVEZ, I. et al. Obesity Affects β 2 Adrenergic Regulation of the Inflammatory Profile and Phenotype of Circulating Monocytes from Exercised Animals. **Nutrients**, v. 11, n. 11, 2 nov. 2019.
- GHOLAMNEZHAD, Z. et al. Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1–8, jan. 2014.
- GIELEN, S. et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 42, n. 5, p. 861–868, 3 set. 2003.
- GIRARDI, M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 1, p. 25–31, jan. 2006.
- GONZÁLEZ, K.; FUENTES, J.; MÁRQUEZ, J. L. Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases. **Korean Journal of Family Medicine**, v. 38, n. 3, p. 111–115, maio 2017.
- GONZALEZ, S. M.; TABORDA, N. A.; RUGELES, M. T. Role of Different Subpopulations of CD8+ T Cells during HIV Exposure and Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 936, 2017.
- GOODWIN, M. L. Blood Glucose Regulation during Prolonged, Submaximal, Continuous Exercise: A Guide for Clinicians. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 4, n. 3, p. 694–705, 1 maio 2010.
- GRAFF, R. M. et al. β 2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8+ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 74, p. 143–153, nov. 2018.
- GRUENER, N. H. et al. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 12, p. 5550–5558, jun. 2001.
- GUNZER, W.; KONRAD, M.; PAIL, E. Exercise-Induced Immunodepression in Endurance Athletes and Nutritional Intervention with Carbohydrate, Protein and Fat—What Is Possible, What Is Not? **Nutrients**, v. 4, n. 9, p. 1187–1212, 4 set. 2012.
- HACKNEY, A. C.; KOLTUN, K. J. The immune system and overtraining in athletes: clinical implications. **Acta Clinica Croatica**, v. 51, n. 4, p. 633–641, dez. 2012.
- HIEJIMA, E. et al. Reduced Numbers and Proapoptotic Features of Mucosal-associated Invariant T Cells as a Characteristic Finding in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 21, n. 7, p. 1529–1540, jul. 2015.
- HINKS, T. S. C. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. **Immunology**, v. 148, n. 1, p. 1–12, maio 2016.
- HISCOCK, N.; PEDERSEN, B. K. Exercise-induced immunodepression- plasma glutamine is not the link. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 93, n. 3, p. 813–822, set. 2002.
- HO, P.-C. et al. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1217–1228, 10 set. 2015.

- HOFFMAN-GOETZ, L.; QUADRILATERO, J. Treadmill exercise in mice increases intestinal lymphocyte loss via apoptosis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 179, n. 3, p. 289–297, nov. 2003.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; ZAJCHOWSKI, S.; ALDRED, A. Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. **Life Sciences**, v. 64, n. 3, p. 191–200, 1999.
- HONG, S.; MILLS, P. J. Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 4, p. 590–599, maio 2008.
- HUANG, H.-W. et al. Regulation of differentiation and function of helper T cells by lymphocyte-derived catecholamines via α_1 - and β_2 -adrenoceptors. **Neuroimmunomodulation**, v. 22, n. 3, p. 138–151, 2015.
- HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. **Trends in Immunology**, v. 40, n. 2, p. 98–112, fev. 2019.
- JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 197–216, 2002.
- JOHNSON, M. O. et al. Nutrients and the microenvironment to feed a T cell army. **Seminars in Immunology**, v. 28, n. 5, p. 505–513, out. 2016.
- JOHNSON-HENRY, K. C. et al. Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 4, p. 1340–1348, abr. 2008.
- KAKANIS, M. W. et al. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. **Exercise Immunology Review**, v. 16, p. 119–137, 2010.
- KELLY, D.; CONWAY, S.; AMINOV, R. Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 326–333, jun. 2005.
- KOAY, H.-F. et al. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. **Nature Immunology**, v. 17, n. 11, p. 1300–1311, nov. 2016.
- KRÜGER, K. et al. Exercise-induced redistribution of T lymphocytes is regulated by adrenergic mechanisms. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 3, p. 324–338, mar. 2008.
- KRÜGER, K. et al. Exercise affects tissue lymphocyte apoptosis via redox-sensitive and Fas-dependent signaling pathways. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 5, p. R1518-1527, maio 2009.
- KRÜGER, K.; MOOREN, F. C. Exercise-induced leukocyte apoptosis. **Exercise Immunology Review**, v. 20, p. 117–134, 2014.
- KRZYWKOWSKI, K. et al. Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 281, n. 4, p. C1259-1265, out. 2001.
- KUNZ, H. E. et al. A single exercise bout augments adenovirus-specific T-cell mobilization and function. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 56–65, 1 out. 2018.

- KURIOKA, A. et al. MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 2, p. 429–440, mar. 2015.
- LANCASTER, G. I. et al. Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. **Exercise Immunology Review**, v. 10, p. 91–106, 2004.
- LEE, Y. W. et al. Immunological impact of Taekwondo competitions. **International Journal of Sports Medicine**, v. 33, n. 1, p. 58–66, jan. 2012.
- LEHRER, R. I. et al. Neutrophils and host defense. **Annals of Internal Medicine**, v. 109, n. 2, p. 127–142, 15 jul. 1988.
- LEITE, G. S. F. et al. Probiotics and sports: A new magic bullet? **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 60, p. 152–160, abr. 2019.
- LI, M. et al. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 831, p. 52–59, 15 jul. 2018.
- MACIVER, N. J.; MICHALEK, R. D.; RATHMELL, J. C. Metabolic regulation of T lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 259–283, 2013.
- MACRI, C. et al. Dendritic cell subsets. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 84, p. 11–21, dez. 2018.
- MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, 15 set. 2017.
- MCBRIDE, J. A.; STRIKER, R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? **PLoS pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006624, 2017.
- MEIEROVICS, A.; YANKELEVICH, W.-J. C.; COWLEY, S. C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 33, p. E3119-3128, 13 ago. 2013.
- MOLINA, M. DEL C. B. et al. Diet assessment in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): Development of a food frequency questionnaire. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 2, p. 167–176, abr. 2013.
- MOOREN, F. C. et al. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 93, n. 1, p. 147–153, jul. 2002.
- MOOREN, F. C.; LECHTERMANN, A.; VÖLKER, K. Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 36, n. 9, p. 1476–1483, set. 2004.
- MORVAN, M. G.; LANIER, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. **Nature Reviews. Cancer**, v. 16, n. 1, p. 7–19, jan. 2016.
- MURRAY, D. R. et al. Sympathetic and immune interactions during dynamic exercise. Mediation via a beta 2-adrenergic-dependent mechanism. **Circulation**, v. 86, n. 1, p. 203–213, jul. 1992.
- NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L. et al. The effects of moderate exercise training on immune response. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 23, n. 1, p. 64–70, jan. 1991.

NIEMAN, D. C. et al. Complement and immunoglobulin levels in athletes and sedentary controls. **International Journal of Sports Medicine**, v. 10, n. 2, p. 124–128, abr. 1989.

NIEMAN, D. C. et al. Physical activity and immune function in elderly women. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 25, n. 7, p. 823–831, jul. 1993.

NIEMAN, D. C. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 26, n. 2, p. 128–139, fev. 1994a.

NIEMAN, D. C. Exercise, infection, and immunity. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15 Suppl 3, p. S131-141, out. 1994b.

NIEMAN, D. C. Marathon training and immune function. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 37, n. 4–5, p. 412–415, 2007.

NIEMAN, D. C.; JOHANSEN, L. M.; LEE, J. W. Infectious episodes in runners before and after a roadrace. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v. 29, n. 3, p. 289–296, set. 1989.

NOVAK, J. et al. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 80, n. 4, p. 271–275, out. 2014.

O'NEILL, L. A. J.; KISHTON, R. J.; RATHMELL, J. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews. Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553–565, set. 2016.

O'ROURKE, A. M.; MESCHER, M. F. The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function. **Immunology Today**, v. 14, n. 4, p. 183–188, abr. 1993.

O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2008, p. 175285, 2008.

PAQUIN-PROULX, D. et al. MAIT cells are reduced in frequency and functionally impaired in human T lymphotropic virus type 1 infection: Potential clinical implications. **PloS One**, v. 12, n. 4, p. e0175345, 2017.

PEAKE, J. M. et al. Recovery of the immune system after exercise. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 122, n. 5, p. 1077–1087, 1 maio 2017.

PEDERSEN, B. K. et al. Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. **International Journal of Sports Medicine**, v. 18 Suppl 1, p. S2-7, mar. 1997.

PEDERSEN, B. K.; BRUUNSGAARD, H. How physical exercise influences the establishment of infections. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 19, n. 6, p. 393–400, jun. 1995.

PEDERSEN, B. K.; TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **British Journal of Sports Medicine**, v. 34, n. 4, p. 246–251, ago. 2000.

PEDERSEN, L. et al. Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 3, p. 554–562, 8 mar. 2016.

- PETERS, E. M. et al. Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. **European Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 2, p. 124–131, set. 2006.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 98, n. 4, p. 1154–1162, abr. 2005.
- PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. **Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society**, v. 57 Suppl 10, p. 43–51, nov. 2006.
- PISTILLO, M. et al. The effects of age and viral serology on $\gamma\delta$ T-cell numbers and exercise responsiveness in humans. **Cellular Immunology**, v. 284, n. 1–2, p. 91–97, ago. 2013.
- PUGH, J. N. et al. Prevalence, Severity and Potential Nutritional Causes of Gastrointestinal Symptoms during a Marathon in Recreational Runners. **Nutrients**, v. 10, n. 7, 24 jun. 2018.
- PYNE, D. B. et al. Probiotics supplementation for athletes - clinical and physiological effects. **European Journal of Sport Science**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2015.
- RADOM-AIZIK, S. et al. Serum from exercising humans suppresses t-cell cytokine production. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 75–81, nov. 2007.
- ROBSON, P. J. et al. Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. **International Journal of Sports Medicine**, v. 20, n. 2, p. 128–135, fev. 1999.
- ROHDE, T.; MACLEAN, D. A.; PEDERSEN, B. K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 6, p. 856–862, jun. 1998.
- ROJAS VEGA, S. et al. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. **Brain Research**, v. 1121, n. 1, p. 59–65, 22 nov. 2006.
- ROONEY, B. V. et al. Lymphocytes and monocytes egress peripheral blood within minutes after cessation of steady state exercise: A detailed temporal analysis of leukocyte extravasation. **Physiology & Behavior**, v. 194, p. 260–267, 1 out. 2018.
- SALOU, M.; FRANCISZKIEWICZ, K.; LANTZ, O. MAIT cells in infectious diseases. **Current Opinion in Immunology**, v. 48, p. 7–14, out. 2017.
- SCHWELLNUS, M. et al. How much is too much? (Part 2) International Olympic Committee consensus statement on load in sport and risk of illness. **British Journal of Sports Medicine**, v. 50, n. 17, p. 1043–1052, set. 2016.
- SHARMA, D.; FARRAR, J. D. Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 42, n. 6, p. 709–717, 1 dez. 2020.
- SHING, C. M. et al. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. **European Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 1, p. 93–103, jan. 2014.
- SIMPSON, R. J. et al. Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 232–239, fev. 2009.

SIMPSON, R. J. et al. Exercise and the Regulation of Immune Functions. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 135, p. 355–380, 2015.

SIMPSON, R. J. et al. Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 22, p. 8–27, 2016.

SIMPSON, R. J. et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection? **Exercise Immunology Review**, v. 26, p. 8–22, 2020.

SLOTA, C. et al. Norepinephrine preferentially modulates memory CD8 T cell function inducing inflammatory cytokine production and reducing proliferation in response to activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 46, p. 168–179, maio 2015.

SPIELMANN, G. et al. The effects of age and latent cytomegalovirus infection on the redeployment of CD8+ T cell subsets in response to acute exercise in humans. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 39, p. 142–151, jul. 2014.

STEFANI, L.; GALANTI, G. Physical Exercise Prescription in Metabolic Chronic Disease. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1005, p. 123–141, 2017.

SUKUMAR, M. et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 10, p. 4479–4488, out. 2013.

TARD, C.; ROUXEL, O.; LEHUEN, A. Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. **Biomedical Journal**, v. 38, n. 6, p. 484–495, dez. 2015.

TIERNAN, C. et al. Salivary IgA as a Predictor of Upper Respiratory Tract Infections and Relationship to Training Load in Elite Rugby Union Players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, 23 jan. 2019.

TOSSIGE-GOMES, R. et al. Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 47, n. 6, p. 492–498, jun. 2014.

TOUCH, S.; CLÉMENT, K.; ANDRÉ, S. T Cell Populations and Functions Are Altered in Human Obesity and Type 2 Diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 17, n. 9, p. 81, set. 2017.

TREINER, E. et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 164–169, 13 mar. 2003.

UKENA, S. N. et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. **PLoS One**, v. 2, n. 12, p. e1308, 12 dez. 2007.

WALSH, N. P. et al. The effects of high-intensity intermittent exercise on the plasma concentrations of glutamine and organic acids. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 77, n. 5, p. 434–438, abr. 1998.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 17, p. 6–63, 2011.

WALSH, N. P. Recommendations to maintain immune health in athletes. **European Journal of Sport Science**, v. 18, n. 6, p. 820–831, jul. 2018.

WELLS, J. M. et al. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108 Suppl 1, p. 4607–4614, 15 mar. 2011.

WEST, N. P. et al. Gut Balance, a synbiotic supplement, increases fecal *Lactobacillus paracasei* but has little effect on immunity in healthy physically active individuals. **Gut Microbes**, v. 3, n. 3, p. 221–227, jun. 2012.

WEST, N. P. et al. Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. **Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 33, n. 4, p. 581–587, ago. 2014a.

WEST, N. P. et al. Supplementation with a single and double strain probiotic on the innate immune system for respiratory illness. **e-SPEN Journal**, v. 9, n. 5, p. e178–e184, 1 out. 2014b.

WITARD, O. C. et al. High-intensity training reduces CD8+ T-cell redistribution in response to exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 9, p. 1689–1697, set. 2012.

ZHENG, C.; CHEN, X.-K.; ZHOU, Y. Acute glutamine ingestion modulates lymphocytic responses to exhaustive exercise in the heat. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 43, n. 3, p. 213–220, mar. 2018.

APÊNDICES

Apêndice A – Publicação referente aos dados do doutorado

Batatinha H, Tavares-Silva E, Leite GSF, Resende AS, Albuquerque JAT, Arslanian C, Fock RA, Lancha AH Jr, Lira FS, Krüger K, Thomatieli-Santos R, Rosa-Neto JC. Probiotic supplementation in marathonists and its impact on lymphocyte population and function after a marathon: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Sci Rep.* 2020 Nov 2;10(1):18777. doi: 10.1038/s41598-020-75464-0. PMID: 33139757; PMCID: PMC7608678.



OPEN Probiotic supplementation in marathonists and its impact on lymphocyte population and function after a marathon: a randomized placebo-controlled double-blind study

Helena Batatinha^{1,9}✉, Edgar Tavares-Silva², Geovana S. F. Leite³, Ayane S. Resende³, José A. T. Albuquerque⁴, Christina Arslanian⁴, Ricardo A. Fock⁵, Antônio H. Lancha Jr³, Fabio S. Lira⁶, Karsten Krüger⁷, Ronaldo Thomatieli-Santos^{2,8} & José C. Rosa-Neto¹

Probiotic supplementation arises as playing an immune-stimulatory role. High-intensity and -volume exercise can inhibit immune cell function, which threatens athletic performance and recovery. We hypothesized that 30 days of probiotic supplementation could stabilize the immune system of athletes preventing immune suppression after a marathon race. Twenty-seven male marathonists were double-blinded randomly into probiotic (*Bifidobacterium- animalis-subsp.-Lactis* (10×10^9) and *Lactobacillus-Acidophilus* (10×10^9)) + 5 g of maltodextrin) and placebo (5 g of maltodextrin) group. They received 30 sachets and supplemented 1 portion/day during 30 days before the race. Blood were collected 30 days before (rest), 1 day before (pre), 1 h after (post) and 5 days after the race (recovery). Both chronic and acute exercise modulated a different T lymphocyte population (CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T-cells), increasing pre-race, decreasing post and returning to rest values at the recovery. The total number of CD8 T cell and the memory subsets statistically decreased only in the placebo group post-race. Pro-inflammatory cytokine production by stimulated lymphocytes decreased in the probiotic group after the supplementation period. 30 days of probiotic supplementation maintained CD8 T cell and effector memory cell population and played an immunomodulatory role in stimulated lymphocytes. Both, training and marathon modulated a non-classical lymphocyte population regardless of probiotic supplementation.

Over the last few years, various studies have shown a close interaction between the microbiota and the peripheral immune system^{1,2}. Gut microbiota is composed by billions of different species of bacteria with pathogenic or symbiotic characteristics, depending on the environment homeostasis. This microbiota performs many immunoregulatory functions and plays a role in immune development and function³⁻⁵. In this field, probiotic supplementation arises as a strategy to treat metabolic, autoimmune and inflammatory diseases⁶. Probiotics are

¹Immunometabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil. ²Programa de pós-graduação em psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, Santos, Brazil. ³Laboratory of Applied Nutrition and Metabolism, School of Physical Education and Sports, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁶Exercise and Immunometabolism Research Group, Post-Graduation Program in Movement Sciences, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), School of Technology and Sciences, Presidente Prudente, Brazil. ⁷Department of Exercise Physiology and Sports Therapy, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany. ⁸Department of Bioscience, Universidade Federal de São Paulo, Santos, Brazil. ⁹Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, 1524, Prof Lineu Prestes Av., Sao Paulo, SP 05508-000, Brazil. ✉email: batatinha.helena@usp.br

	Placebo (n = 13)	Probiotic (n = 14)	p
Age (years)	40.46 ± 7.79	35.96 ± 5.81	0.09
High (m)	1.75 ± 0.08	1.75 ± 0.06	0.78
Weight (kg)	72.67 ± 10.20	79.30 ± 10.99	0.11
Fat mass (%)	11.32 ± 4.40	16.9 ± 5.80*	0.01
Free fat mass (%)	61.12 ± 9.03	62.51 ± 6.78	0.89
Body density (kg/l)	1.06 ± 0.01	1.05 ± 0.01*	0.02

Table 1. Anthropometry and physical characteristics of the athletes. Data presented as mean ± standard deviation, *Different from placebo. Significant when $p < 0.05$.

classified as commensal bacteria living in a symbiotic manner with the host⁷. They compete for nutrient with pathogenic bacteria, preventing their colonization. Probiotics also have an immune-stimulatory effect. Milk enriched with *Bifidobacterium lactis* (HN019 5×10^9) increased the number of neutrophils and CD4 and CD8 T lymphocytes⁸. In addition, 11 weeks of *Lactobacillus fermentum* (1×10^9 UFC) supplementation prevented upper respiratory tract infections (URTI) in endurance athletes⁹.

High-intensity and -volume exercise such as a marathon race has been associated with immunosuppression by decreasing immune cell function, which enhances susceptibility to viral infections^{10,11}. After a marathon race, the function of neutrophils, T lymphocytes and Natural-killer (NK) cells, as well as salivary immunoglobulin A (IgA), are reduced¹². Moreover, a single bout of exhaustive exercise increases cortisol concentration in the plasma. High levels of cortisol inhibit lymphocyte proliferation and monocyte function¹³. Similarly, decrease in energetic substrates for immune cells, such as glucose and glutamine, has been found¹⁴. All these events might contribute to increased susceptibility to URTI.

Consequently, several studies started to investigate strategies to avoid immunosuppressive periods and prevent the incidence of URTI, e.g. acute or chronic supplementation of glucose and glutamine^{15–17}. The results showed that a single bout of exhaustive exercise by itself is not able to increase susceptibility to URTI unless the athlete is in overtraining or fatigue condition. Thus, boosting the immune system of athletes during training is more effective than acute intervention before a race.

Regarding these points, we hypothesized that 30 days of probiotic supplementation would strengthen the immune system of athletes and prevent a decrease in immune function after a marathon race. We aimed to evaluate the alterations caused by a marathon in the lymphocyte population and function, and the effects of probiotics in this process.

Results

The anthropometry and physical characteristics of the athletes are shown in Table 1. Probiotic group showed higher fat mass percentage and body density comparing to placebo. Data from the questionnaires showed no disease, medicine or immune boosting supplements consumption by any athlete and an average sleep of 6 h/night in both groups (data not shown). The average race time was 4.08 ± 0.55 h. Non-statistical difference was observed for the training volume during the 30 days of supplementation (Placebo 3.93 ± 1.73 h/week, 62.83 ± 49.79 km/week; Probiotic 5.03 ± 2.63 h/week, 56.06 ± 25.59 km/week) (Supplementary Table 1).

Cytokine production in whole blood under LPS stimulation. Interleukin (IL)-10 increased in both groups regardless of lipopolysaccharides (LPS) stimulation post-race (Fig. 1A), suggesting an effect of exercise. Non-statistical difference was observed in the levels of IL-4 (Fig. 1B) and IL-6. However, at the times rest, pre-race and recovery the probiotic group produced IL-6 only with stimulation (Fig. 1C). In both groups, a similar increase on IL-15 and IL-2 production under LPS stimulation was found (Fig. 1D and E). However, the change of IL-2 was only statistically significant in the probiotic group. IL-8 was responsive to LPS only post-race in both groups (Fig. 1F). An impaired LPS-induced IL-1 β and Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) was found after the race, which had not been recovered (Fig. 1G and H). No significant changes in the concentration of Interferon gamma (IFN γ) was found (Fig. 1I).

Probiotic supplementation maintained total CD8 T cells and memory phenotype population after the race. The changes in blood cell numbers are shown in Supplementary Table 2. No effect of probiotic supplementation was found. In both groups, total leucocytes numbers increased post-race. The sharpest increase was found for neutrophils, followed by monocytes, while lymphocyte numbers decreased. All cell populations returned close to the rest levels at recovery.

The representative flow dot-plot of lymphocytes showing CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ T cells percentage is presented on Fig. 2A. The total number of CD3⁺ T cells decreased in both groups after the race; in the probiotic group, it was regulated back to baseline at recovery (Fig. 2B). CD4⁺ T cell decreased post-race compared to rest in the probiotic group (Fig. 2C), while CD8⁺ T cells decreased only in the placebo group in response to the marathon race ($p < 0.05$) (Fig. 2D). No change was observed in the CD4/CD8 ratio between the groups at any time (Fig. 2F).

In order to understand if the race could impact immunological memory phenotype and if probiotic supplementation could modify it, memory phenotype of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was analyzed. For CD8⁺ T cells, the

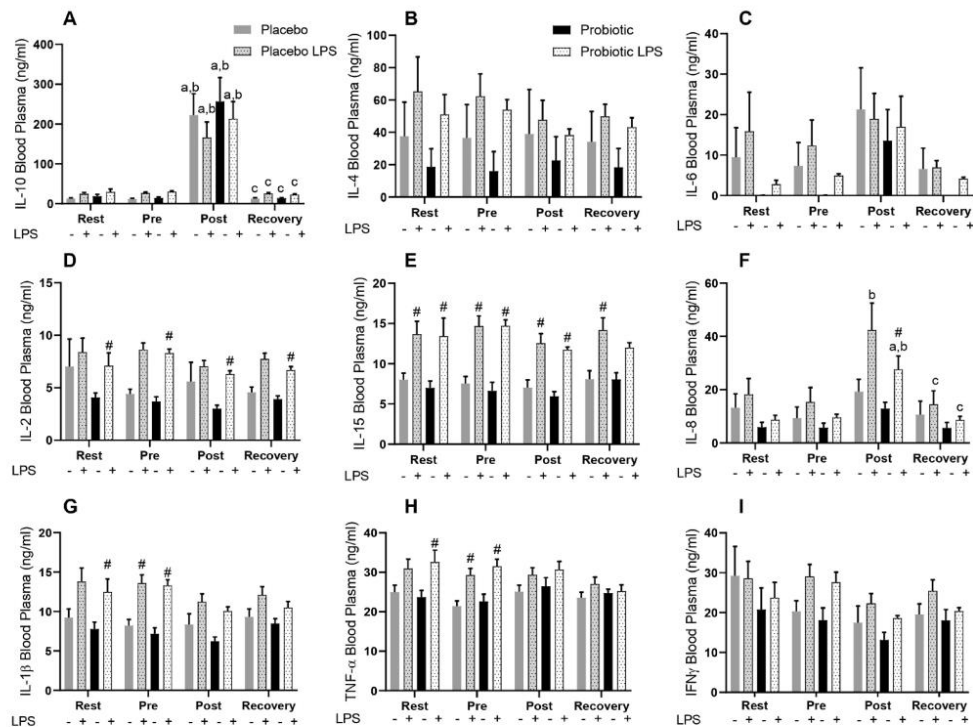


Figure 1. Concentrations of cytokine in plasma stimulated or not with LPS, IL-10 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-2 (D), IL-15 (E), IL-8 (F), IL-1 β (G), TNF α (H) and IFN γ (I), of Marathonists supplemented with placebo (grey bar) or probiotic (black bar). ^aDifferent from Rest. ^bDifferent from Pre. ^cDifferent from Post. [#]Different from LPS in the same group (two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 12 in each group).

total counts of effector memory (EM), central memory (CM) and effector memory expressing CD45Ra (EMRA) statistically decreased only in the placebo group in response to the marathon. Numbers of naive CD8⁺ T cells were twice as high in the probiotic group after the race as in the placebo group; however, the increase was not statistically significant (Fig. 3). For the CD4⁺ T cell population, the probiotic group tended to increase EMRA CD4 T cells at the recovery comparing to placebo group ($p = 0.06$) (Supplementary Fig. 1).

The marathon race modulated the non-classical double negative T lymphocyte population. Athletes started with approximately 11% of the non-classical double-negative T cell population (at rest), which doubled pre-race—comprised in an intense period of training. These cells decreased post-race compared to pre and increased again at recovery (Fig. 2E).

Moreover, these cells presented a negative correlation with age (Fig. 2G), also observed in Gamma-delta ($\gamma\delta$) T and Mucosal associated invariant T (MAIT) cells (see “Discussion” section). The promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) gene expression; a transcription factor expressed in $\gamma\delta$ T cells and MAIT cells, showed a response to the marathon similar to the double-negative T cells (Fig. 4A). ROR γ t mRNA followed the same pattern (Fig. 4B).

Probiotic supplementation induces immunomodulation in stimulated lymphocytes. Stimulated lymphocytes from the probiotic group, presented a two-fold increase of pro-inflammatory cytokines production (IFN γ , IL-1 β , IL-6 and TNF α) at rest compared to the placebo (only for IFN γ $p < 0.05$) (Fig. 5). After 30 days of probiotic supplementation (Pre-race), all pro-inflammatory cytokines significantly decreased comparing to rest (Fig. 5A,D,G and H); IL-2 decreased post-race compared to rest in the probiotic group, whereas it was partially restored at recovery (Fig. 5E). IL-8 increased in both groups post-race compared to pre-race and decreased only in the placebo group at recovery (Fig. 5I). Non-statistical significance was observed for IL-10, IL-15 and IL-4 (Fig. 5B,C and F). Similarly, no significant changes were found for gene expression of the Nuclear factor kappa B (NF κ B) and Toll-like receptor 4 (TLR-4) (Fig. 4). IL-17 was not detected to any group in any time point.

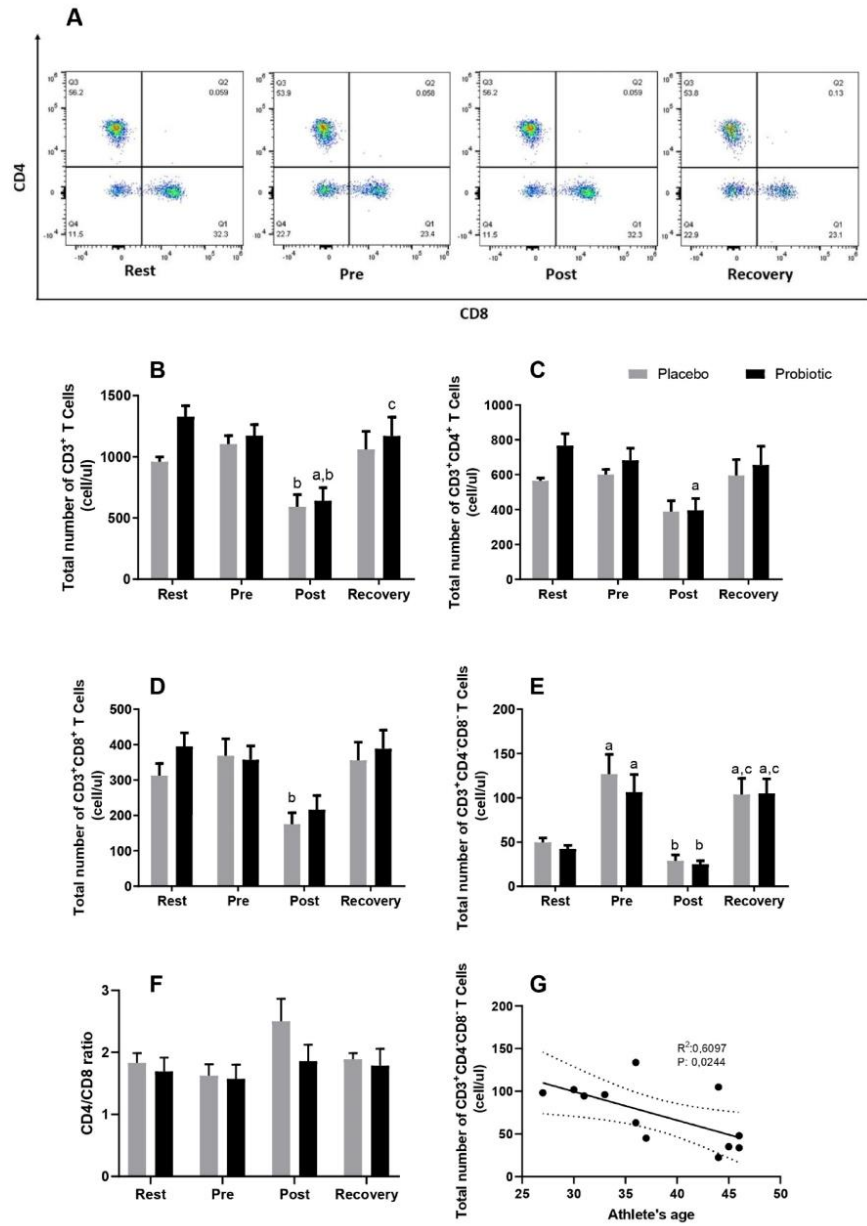


Figure 2. Dot plot representing the percentage of T lymphocyte subpopulations in response to the marathon (A) and total number of lymphocyte subsets CD3⁺ (B) CD3⁺CD4⁺ (C) CD3⁺CD8⁺ (D) CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (E), CD4/CD8 ratio (F) and the correlation between CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cells and athletes' age (G). Marathonists supplemented with placebo (grey bar) or probiotic (black bar). ^aDifferent from Rest. ^bDifferent from Pre. ^cDifferent from Post. (Two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 12 in each group).

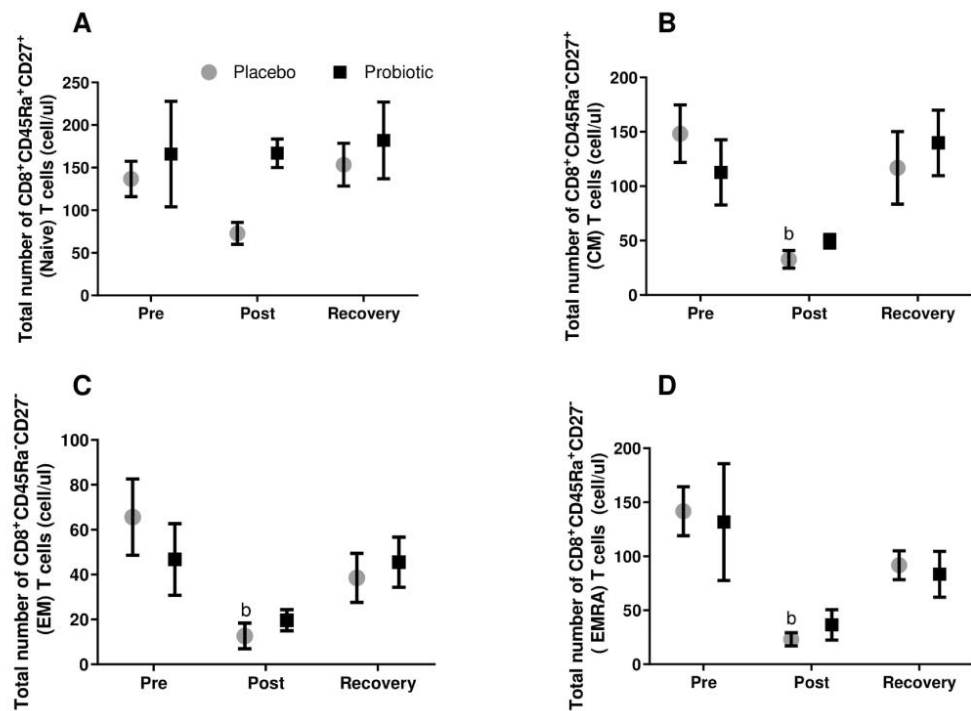


Figure 3. Total number of CD8 T memory subsets: Naïve (A); central memory (B); effector memory (C); effector memory RA (D). Marathonists supplemented with placebo (grey circle) or probiotic (black square). ^bDifferent from Pre (two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 6 in each group).

Probiotic supplementation did not prevent URTI. Data from the URTI questionnaire showed that both placebo and probiotic group presented low level of URTI with no statistical difference between the groups. In addition, both groups presented at least one upper respiratory symptom during ten-days after a marathon race. However, the symptoms reported were of low severity level in both groups with non-statistical difference between the groups regarding the incidence and severity score of symptoms during this ten-day period (Fig. 6).

Discussion

One bout of high-intensity and prolonged exercise is known to induce acute leukocytosis and increase concentrations of cytokines such as IL-6 and IL-10 in the serum. Our findings reproduced this classical immunologic response and 30 days of probiotic supplementation did not affect this response. However, the selective characterization of immune cell subtypes added information about the kinetics of changes of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T cells. These cells increased proportionally with the training period (rest to pre-race) regardless probiotic supplementation, decreased in response to the marathon (post) and were regulated to pre-race levels five days after (recovery). The cells are seldom investigated in exercise immunology and, as we will discuss below, it may be due to the differential regulation of $\gamma\delta$ T cells and/or MAIT cells, which represent two important T cell subtypes of mucosal immunity. Probiotic supplementation affected total number of CD8⁺ T cell and memory phenotype; and regulated lymphocytes response to stimulation.

The increase in circulating immune cells in response to high-intensity and prolonged exercise, such as a marathon race, was previously described by Davidson and collaborators (1987)¹⁸. It happens in a catecholamine-dependent manner, and cells tend to return to baseline values within few hours after exercise cessation¹⁹. Neutrophils are the cell type most commonly responsible for this increase, with a small contribution of monocytes and NK cells, while lymphocyte numbers are temporarily decreased²⁰. Cytokine concentration in serum is also altered in response to acute exercise. IL-6, known as a pleiotropic cytokine, is sharply increased in circulation in response to muscle contraction during exercise. This muscle-derived IL-6 has an important anti-inflammatory

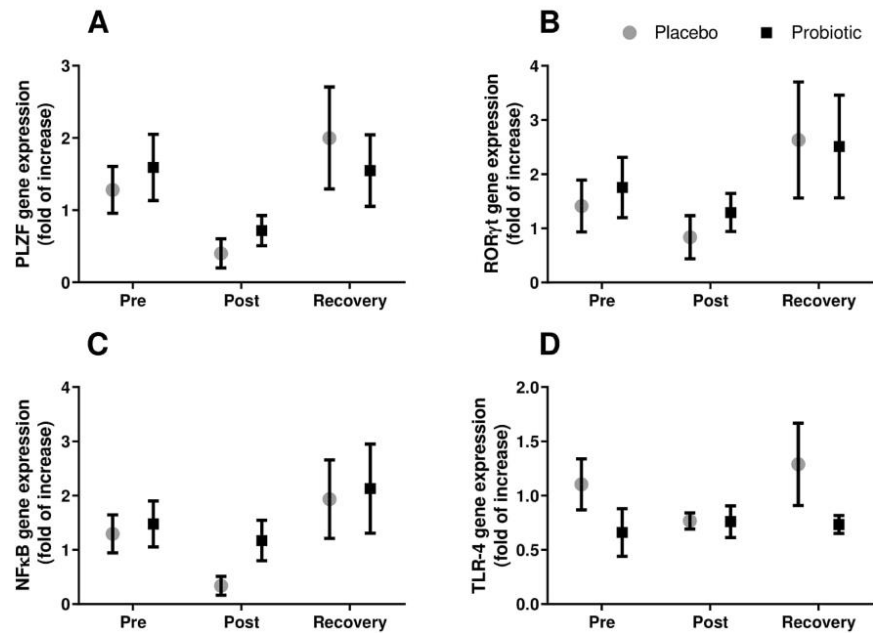


Figure 4. Gene expression of PLZF (A), ROR γ t (B), NF κ B (C) and TLR-4 (D) of lymphocytes cultured for 24 h with PMA from marathonists supplemented with placebo (grey circle) or probiotic (black square). (Two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 6 in each group).

effect by inducing IL-10 and IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) production²¹. Our results reproduced these findings, since leukocytosis and an increase in both IL-6 and IL-10 post-race was found regardless of LPS stimulation.

In order to characterize the lymphocyte subpopulation, a whole blood immunophenotyping was performed. There was a significant decrease in the amount of CD3⁺ T cells in both groups and of CD8⁺ T cells in the placebo group after the race. It presented a profile similar to the total lymphocyte number; the amount of CD4⁺ T cells was not altered. Tossige-Gomes and collaborators (2014)²² have not found significant differences in the amount of T helper (Th) (CD3⁺CD4⁺) or T cytotoxic (CD3⁺CD8⁺) cells after an exhaustive exercise session. However, another study indicated a decrease in the percentage of CD8⁺ T cells in response to exhaustive exercise, without changing total cell numbers²³.

Cytotoxic T cells are important to neutralize viral infections and tumor growth, since they directly inactivate infected and defective cells, preventing its proliferation. Human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C patients presented decreased number and function of CD8⁺ T lymphocytes^{24,25}, indicating that a decline in this cell population may contribute to acute infections. As described above, the probiotic group did not present a significant decrease in CD8⁺ T cells one hour after the race.

The memory CD8⁺ T cell subset was also affected by the race and probiotic supplementation. The total number of EM, EMRA and CM decreased post-race only in the placebo group, returning 5 days after. Spielmann and collaborators (2013)²⁶ found that 30 min of cycling (performed at 80% VO_{2max}) mobilized CD8⁺ naive cells more effectively in younger individuals compared to older ones. Exercise was also able to mobilize highly differentiated and EMRA CD8⁺ T cells subsets. In another study from the same group²⁷, a similar exercise protocol increased both CD4⁺ and CD8⁺ T cells EM and EMRA subsets; this difference between pre- and post-exercise was maintained after eight days of ex-vivo cell expansion. As long as these cells differentiate, they lose their proliferative capacity, however, they react quickly to pathogen stimulation, improving immune response²⁸. A decrease in EM, EMRA and CM populations might increase susceptibility to viral infections.

T helper cells produce pro- and anti-inflammatory cytokines that recruit and activate monocytes, B lymphocytes and cytotoxic lymphocytes, modulating immune response according to the stimulus²⁹. In our results, we found that at rest, lymphocytes in the probiotic group presented exacerbated production of the pro-inflammatory cytokines IFN γ , IL-1 β , IL-6 and TNF α when stimulated. This over-response was restored pre-race. This suggests that 30 days of probiotic supplementation could modulate immune response of lymphocytes to stimulation. IL-2 decreased post-race compared to rest in the probiotic group. However, it was partially restored 5 days after the race (recovery). This cytokine is mainly produced by activated lymphocytes and can be considered as a T cell growth factor by stimulating lymphocyte proliferation, survival and effector function³⁰.

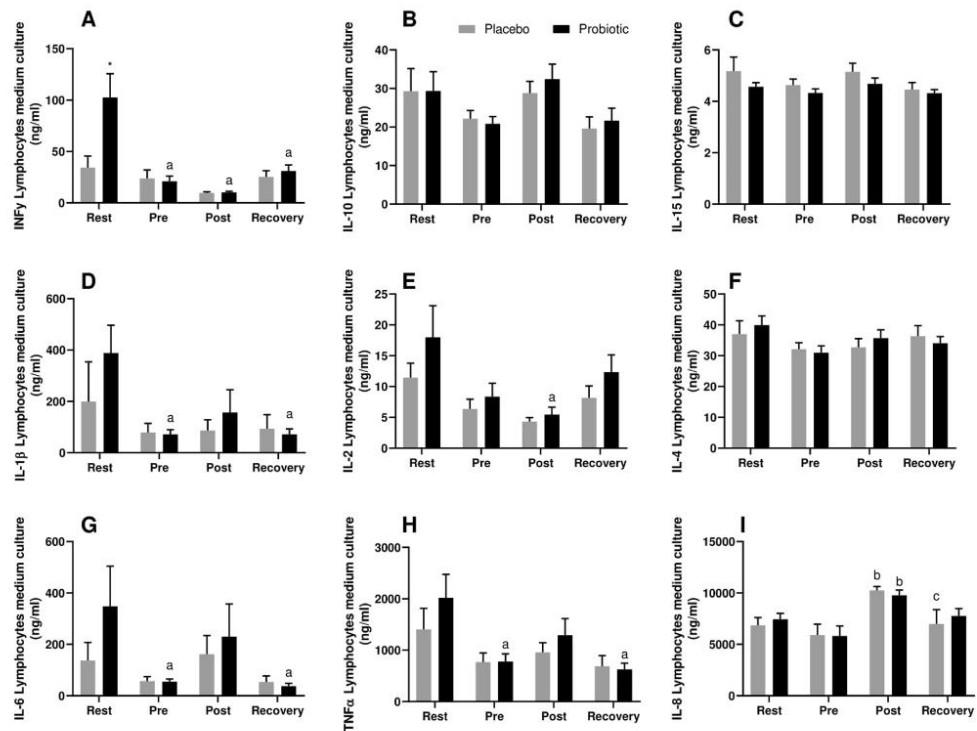


Figure 5. Cytokine production by lymphocytes in the culture medium stimulated with PMA. IFN γ (A), IL-10 (B), IL-15 (C), IL-1 β (D), IL-2 (E), IL-4 (F), IL-6 (G), TNF α (H), IL-8 (I) in Marathonists supplemented with placebo (grey bar) or probiotic (black bar). *Different from Rest. ^aDifferent from Rest. ^bDifferent from Pre. ^cDifferent from Post. (Two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 10 in each group).

Within the lymphocyte subpopulation, the highest modulation by the marathon race was found for CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cells. Representing around 5% of the total circulating T cells; these non-classical lymphocytes have been described in the literature a few years ago and play an important role in responding quickly to viral and bacterial infections. One of the first types described was Invariant Natural Killer (iNKT) cells—they recognize antigens by the molecule CD1d, which is located in the surface of antigen-presented cells³¹. Once activated, iNKs produce a large amount of IL-4 and IFN- γ , also having a cytotoxic effect³². MAIT cells are another type of non-classical lymphocytes recently described. When activated, these cells are fast and efficient to release IFN γ , TNF- α , granzyme B, perforins, IL-17, and IL-22^{33,34}. MAIT cells are directly correlated with anti-microbial immunity, since they are absent in germ-free animals³⁵. It also plays a role in mucosal immunity by preventing respiratory infections³⁶. The circulating concentration of these cells are decreased in patients with infectious and inflammatory bowel disease (IBD)^{37,38}.

$\gamma\delta$ T cells are cytotoxic effector non-classical lymphocytes that play an important role in rapid response to a variety of pathogens, removing bacteria and eradicating tumor cells^{39,40}. They are primarily located in the reproductive, respiratory and gastrointestinal epithelium, but also represent 2–15% of the total CD3⁺ circulating cells⁴⁰. $\gamma\delta$ T cells are highly responsive to acute stress and immediately increase in the circulation in response to short-term acute exercise. Nevertheless, these cells also seem to be affected by chronic exercise, since they were found to be proportionally higher in trained female soccer players compared to untrained individuals⁴¹.

Although we have not observed differences between the probiotic and placebo group regarding the CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cell population, we found a significant increase in the amount of non-classical lymphocytes pre-race compared to rest. In this period, athletes were in a high-volume regime of training, indicating that chronic high-intensity and volume exercise may modulate this cell population. Moreover, these cells were also affected by a single bout of exercise, since they decreased one hour after the marathon, which suggests that both chronic and acute exercise may modulate non-classical T lymphocytes.

The transcription factor PLZF is highly expressed and essential for MAIT and $\gamma\delta$ T cell effector function^{42,43}. PLZF was observed to decrease in patients with Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), a deltaretrovirus infection⁴⁴. ROR γ t is also expressed by both cell populations and is responsible for their ability to release

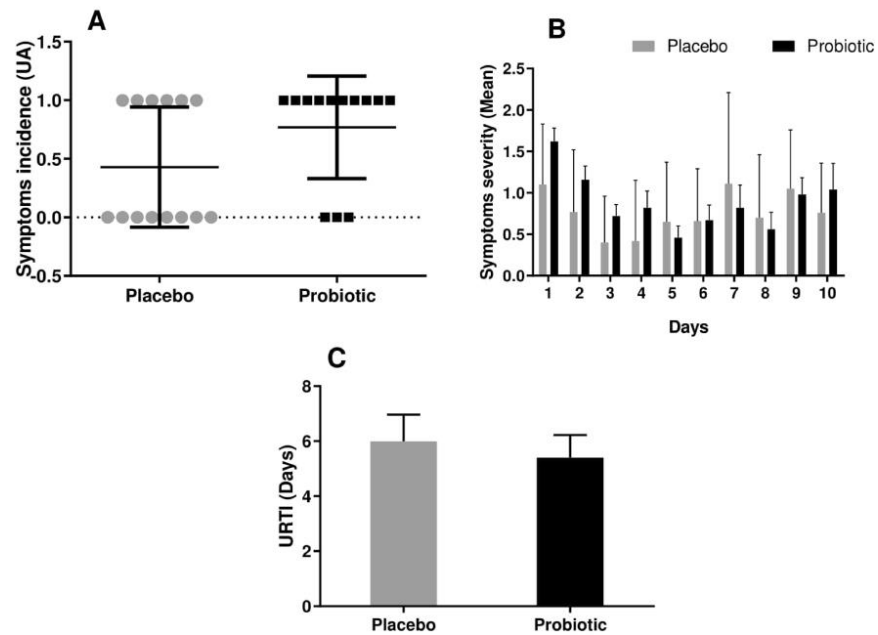


Figure 6. Symptoms incidence (A), symptoms severity (B) and upper respiratory tract infection (C) reported by marathonists supplemented with placebo (grey bar) or probiotic (black bar), during 10 days after the race. (Two-way ANOVA followed by Tukey). (N = 13 in each group).

IL-17^{43,45}. Although not significant, we observed a similar path between the gene expression of PLZF and ROR γ t with the non-classical lymphocytes, decreasing post-race and increasing at recovery.

Furthermore, both MAIT⁴⁶ and $\gamma\delta$ T cells⁴⁷—unlike iNKT cells⁴⁸—are reduced in elderly people, which indicates a negative correlation between age and the number of circulating cells. In our results, we found this correlation (see Fig. 5F), which is a strong indicative that these CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cells may be both MAIT and $\gamma\delta$ T cells, with more contribution of $\gamma\delta$ T cells, since they are affected by acute and chronic exercise. However, we have not labelled these cells with specific antibodies to detect the specific population.

In order to understand if probiotic supplementation affects the incidence of URTI after a marathon, a questionnaire was applied from day zero to ten after the race. Both groups presented low level of URTI symptoms during this period; However, neither the placebo nor the probiotic group showed significant symptom severity or incidence during these ten days. In previous studies⁴⁹, the “open window” hypothesis was discussed. This concept describes that up to 72 h after intense and prolonged exercise, the immune cells exhibit poor response against pathogens, which increase susceptibility to infection. It was speculated that this acute immunosuppression was the result of a decrease in substrate concentration since it was at least partly prevented by acute glucose and/or glutamine supplementation⁵⁰.

In the last decade, however, scientists have associated increased URTI incidence with repeated bouts of strenuous exercise without proper recovery (overtraining), culminating in chronic immunosuppression^{50,51}. In this regard, chronic supplementation of specific substrates might be an effective strategy. We have not evaluated the URTI symptom before the race. It is possible that the low level of URTI was already present before the race, as a consequence of the training volume.

It is likely that the period of supplementation (30 days before the race) was a limitation of the study and could have mitigated possible benefits. West and colleagues (2013)⁵² supplemented physical-active individual with the same probiotic mix that we used, in a lower dose (1×10^{10}), for 150 days. They found that probiotic group had 27% reduced risk to URTI and were less absent in the training sections than the placebo group. In another study from the same group⁵³ with the same supplement dosage and period; probiotic decreased circulating matrix metalloproteinases 1 (MMP-1), a extracellular matrix degrading enzymes that has been implicated in atherogenesis, but had no difference in the activities of Neutrophils, Monocytes and NK cells. They suggest that probiotic supplementation, besides reducing URTI risk, had no effect on cytokines production and cellular activity because the group supplemented was immunocompetent; the results could be different if tested in children, elderly or endurance athletes.

Furthermore, it is important to highlight that both studies were performed in rest conditions, so the effects of a single bout of exercise on the immune cells and the interactions of probiotics in this context were not evaluated.

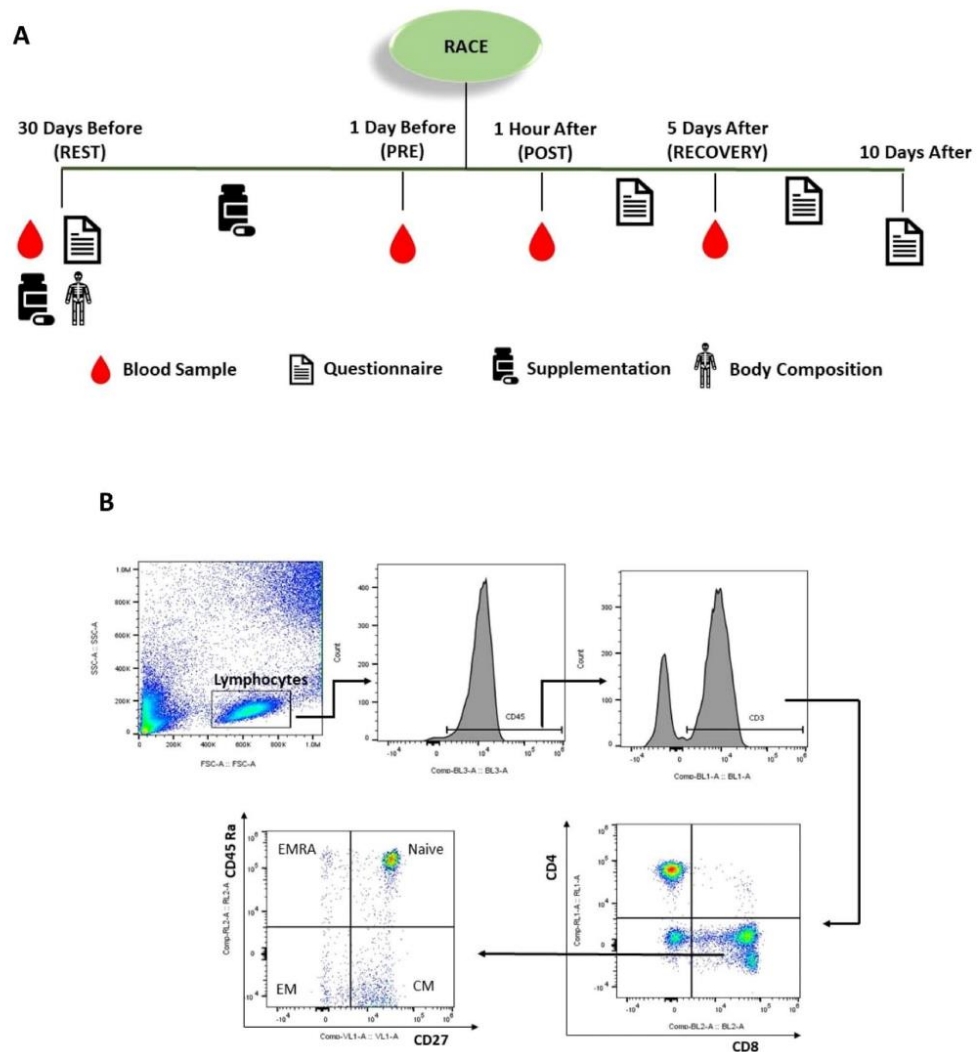


Figure 7. Experimental design (A) Gating strategy of lymphocyte populations by flow cytometry (B). CD45 (BL-3), CD3 (BL-1), CD4 (RL-1), CD8 (BL-2), CD45RA (RL-2), CD27 (VL-1). CM (central memory) EM (effector memory) EMRA (effector memory RA).

Here we presented data from before and after 30 days of supplementation, after the race, and on the recovery. We found the probiotic supplementation, in rest condition, modulated lymphocytes' response to stimulation; and after an acute stress (Marathon race) played a role on the CD8⁺ T cells population of marathon runners.

In conclusion, even though we have not found changes in URTI incidence in the athletes, 30 days of probiotic strain supplementation was able to maintain the total number of CD8⁺ T cells and effector memory population; and to modulate lymphocytes' response to stimulation, suggesting a role of probiotics in the athletes' immune system. This paper also opened a new avenue in the immunology field, showing that both chronic and acute high-intensity and -volume exercise can modulate an important lymphocyte subpopulation (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T cells). The limitations of this study are the period of supplementation, not having evaluated URTI symptoms before the race and marked the double-negative T cell population; and not having accessed the microbiota composition of

the athletes. More studies with different supplementation schedules and probiotic composition are necessary to better understand the impact of probiotics in the immune system of athletes. Further studies are also necessary to identify the role of non-classical T lymphocytes in trained individuals.

Methods

Ethical approval. All the experimental protocol of this project was approved by the Human Research Ethics Committee of the Biomedicine Institute of Universidade de São Paulo and by the Brazilian National Research Ethics Committee. It was registered as a clinical trial on January 31st, 2017 by the protocol number: 61892116.9.0000.5467.

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained for all the participants. They received orientations regarding the protocol and assigned an informed consent statement confirming they were aware of the benefits and risks and they could quit at any time.

Participants. Forty male marathonists aged between 30–45 years volunteered for the study. The participants were randomized in a double-blind way (utilizing the program MINITAB) by a draw at upon their enrollment in the study. A researcher who was involved with the study was responsible for the randomization and the supplementation delivery. Thirteen participants abandoned the protocol (7 in the placebo and 6 in the probiotic group), whether because they could not run on the day of the race, were unable to finish the race or decided to quit before the end of the study; thus, 27 athletes remained (n = 13 in the placebo group, n = 14 in the probiotic group). The inclusion criterion was having completed at least one marathon before the study, being regular runner for at least 2 years, aged between 25 and 45 years and non-consumers of probiotic products. The exclusion criteria were smoking, any known cardiovascular, metabolic, or neurological disease, consumption of any probiotic product, use of medication that could mistake the results (antibiotic and anti-fungi in the last 6 months previous the first data point; anabolic steroids and hormones), regular use of any supplements but carbohydrates, protein and vitamins (which were all reported). All volunteers answered a questionnaire informing nutritional intake (dietary record of 24 h), quality of sleep and weekly training volume report (training record).

Supplementation. Each athlete in the probiotic group received 30 sachets containing *Bifidobacterium animalis*, subsp. *Lactis* (10×10^9) and *Lactobacillus Acidophilus* (10×10^9) associated with 5 g of maltodextrin (Drogafarma, São Paulo, Brazil). The probiotic stain and the guidelines for consumption were based on Nicholas West' work³². The placebo group received 30 sachets in the same shape, weight and flavor as the probiotic containing 5 g of maltodextrin. All athletes were instructed to consume one sachet per day dissolved in water (preferably at night before the sleep) during the thirty days before the race. A researcher from our group contacted all the athletes every 2 days to ask if the sachets were being consumed properly and if they had any complication (gastrointestinal symptoms, lack of sleep, pain or some other discomfort) related to the supplementation. All the athletes consumed the sachets properly and any complication regarding the supplementation was reported.

Experimental procedure. The experimental design is outlined in the Fig. 7A. Athletes were asked to report to the Laboratory of Nutrition and Exercise at the Sports and Physical Education School—University of São Paulo 30 days before the race, where they signed an informed consent, agreeing to participate in the study. They answered the questionnaires and had their body composition analyses drawn by air displacement plethysmography (BOD POD body composition system; Life Measurement Instruments, Concord, CA, USA), and their first blood sample collected (Rest). The Athletes were randomized in a double-blind manner into probiotic and placebo group and received the sachets for supplementation. On the day before the marathon, athletes were asked to return to the laboratory for blood sample collection (Pre). Food and water intake were reported immediately after the race; sensation of fatigue, race pace and the exact time they finished were recorded. The blood sample were collected one hour after the marathon (Post). Athletes were asked to return to the laboratory for the last blood sample collection five days after the marathon (Recovery).

Upper respiratory tract infection questionnaire. In order to evaluate URTI symptoms, the Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey—21 (WURSS—21), were applied from day zero to day ten after the race. The questionnaire consists of 21 questions investigating health and correlations with flu symptoms. All items are based on the 7-point Likert scale. To verify the installation of URTI two or more symptoms should occur for three or more days in a sequence, same as the protocol utilized by West and colleagues (2013)⁵².

Blood processing. All blood samples were processed within 4 h after collection. Blood count for total leukocytes, neutrophils, monocytes, lymphocytes and platelets were obtained from EDTA anti-coagulated blood from the laboratory of the University of São Paulo hospital. Whole-blood LPS stimulus was obtained from the EDTA anti-coagulated blood; 2 ml of blood were stimulated with 200 μ l of LPS during 1 h at 37 °C, with constant and slow rotation. Immediately after incubation, plasma was collected following the centrifugation procedure (3000 rpm, 15 min, 4 °C) and stored at –80 °C for further analyses. 2 ml of blood without LPS were incubated for the same time and under the same conditions for control. Serum was obtained from dry blood tube by means of centrifugation (3000 rpm, 15 min, 4 °C); half of which was used for cell culture, and the other half, stored at –80 °C for further analysis.

Lymphocyte isolation and cell culture. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 5 ml of EDTA anti-coagulated blood using Histopaque-1119 and Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Merck

KGaA, Darmstadt, Germany). The PBMCs were washed with 12 ml of PBS for pellet generation by centrifugation (1800 rpm, 10 min, 4 °C). The PBMC pellet was resuspended in an RPMI culture medium enriched with 10% of the athlete's own serum and 2% of penicillin. The solution (PBMC + medium) was placed in a 6-well plate (2 ml/well) and incubated for 2 h at 37 °C for monocyte adherence. Lymphocytes were then placed in a 96-well plate (2×10^5 cells/well) and stimulated or not with PMA 0,05% for 24 h. Lymphocytes medium and cells were separated by centrifugation (1800 rpm, 10 min, 4 °C) and stored at -80 °C for further analyses.

Immunophenotyping. One-hundred (100) μ l of heparinized whole blood were added to a tube containing 2 ml of RBC Lysis Solution (Quigam, USA), incubated at 37 °C for 10 min; the cell pellet was obtained after centrifugation (1800 rpm, 10 min, 4 °C). The pellet was washed twice (before and after centrifugation) and labelled with monoclonal antibodies against CD45 (PERcP-BL3), CD3 (FITC-BL1), CD4 (APC-RL1) and CD8 (PE-BL2), CD45Ra (Alex700-RL2) and CD27 (Pacific Blue-VL1) (Fig. 7B). The cells were incubated in the dark for 30 min, washed with PBS once and centrifuged. The final pellet was resuspended with PBS 2% BSA and then read in a flow cytometry Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, USA). Evaluation of lymphocyte memory subsets was only conducted 1 day before, 1 h after, and 5 days after the race.

Cytokine quantification. Production of cytokine interleukin (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, IL-1 β , Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF α) and Interferon-Gamma (IFN γ) in the plasma from whole blood, stimulated or not with LPS and in the medium of lymphocyte cell culture was assessed by Multiplex (R&D Systems, USA).

RNA isolation, reverse transcription, and real-time PCR. The total RNA from lymphocytes was extracted as described by Chomczynski and Sacchi (1987)⁵⁴ and quantified in a spectrophotometer (260 nm/280 nm). cDNA was synthesized from total RNA using reverse transcriptase performed with a high-capacity cDNA kit (Applied Biosystems, Foster, CA). The gene expression was quantified by real-time PCR using power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) as fluorescent dye. GAPDH expression was used as endogenous control. The sequence of primers is shown in Supplementary Table 2.

Statistical analyses. Data were analyzed in GRAPHPAD PRISM 5.0. After the verification of data distribution, the data were considered as normal, so the treatment used was two-way ANOVA with multiple comparison, "group" and "time" as factors, and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). Results were expressed as means \pm standard deviation (SD).

Received: 30 March 2020; Accepted: 3 September 2020

Published online: 02 November 2020

References

1. Fung, T. C., Olson, C. A. & Hsiao, E. Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.* **20**, 145–155 (2017).
2. Kurashima, Y., Goto, Y. & Kiyono, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 3108–3115 (2013).
3. Taylor, S. L., Wesselingh, S. & Rogers, G. B. Host-microbiome interactions in acute and chronic respiratory infections. *Cell. Microbiol.* **18**, 652–662 (2016).
4. Belkaid, Y. & Hand, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* **157**, 121–141 (2014).
5. Bull, M. J. & Plummer, N. T. Part 1: The human gut microbiome in health and disease. *Integr. Med. Encinitas Calif.* **13**, 17–22 (2014).
6. de Oliveira, G. L. V., Leite, A. Z., Higuchi, B. S., Gonzaga, M. I. & Mariano, V. S. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology* **152**, 1–12 (2017).
7. Frei, R., Akdis, M. & O'Mahony, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: experimental data and clinical evidence. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 153–158 (2015).
8. Cox, A. J., Pyne, D. B., Saunders, P. U. & Fricker, P. A. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *Br. J. Sports Med.* **44**, 222–226 (2010).
9. West, N. P. *et al.* Gut Balance, a synbiotic supplement, increases fecal *Lactobacillus paracasei* but has little effect on immunity in healthy physically active individuals. *Gut Microbes* **3**, 221–227 (2012).
10. Hong, S. & Mills, P. J. Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain. Behav. Immun.* **22**, 590–599 (2009).
11. Simpson, R. J. *et al.* Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain. Behav. Immun.* **23**, 232–239 (2009).
12. Nieman, D. C. Marathon training and immune function. *Sports Med. Auckl. NZ* **37**, 412–415 (2007).
13. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985**(98), 1154–1162 (2005).
14. Carvalho-Peixoto, J., Alves, R. C. & Cameron, L.-C. Glutamine and carbohydrate supplements reduce ammonemia increase during endurance field exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* **32**, 1186–1190 (2007).
15. Simpson, R. J., Kunz, H., Agha, N. & Graff, R. Exercise and the regulation of immune functions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **135**, 355–380 (2015).
16. Costa, R. J. S., Jones, G. E., Lamb, K. L., Coleman, R. & Williams, J. H. H. The effects of a high carbohydrate diet on cortisol and salivary immunoglobulin A (s-IgA) during a period of increase exercise workload amongst Olympic and Ironman triathletes. *Int. J. Sports Med.* **26**, 880–885 (2005).
17. Gunzer, W., Konrad, M. & Pail, E. Exercise-induced immunodepression in endurance athletes and nutritional intervention with carbohydrate, protein and fat—what is possible, what is not?. *Nutrients* **4**, 1187–1212 (2012).

18. Davidson, R. J., Robertson, J. D., Galea, G. & Maughan, R. J. Hematological changes associated with marathon running. *Int. J. Sports Med.* **8**, 19–25 (1987).
19. Pedersen, B. K. & Toft, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br. J. Sports Med.* **34**, 246–251 (2000).
20. Bigley, A. B. *et al.* Acute exercise preferentially redeploys NK-cells with a highly-differentiated phenotype and augments cytotoxicity against lymphoma and multiple myeloma target cells. *Brain. Behav. Immun.* **39**, 160–171 (2014).
21. Petersen, A. M. W. & Pedersen, B. K. The role of IL-6 in mediating the anti-inflammatory effects of exercise. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **57**(Suppl 10), 43–51 (2006).
22. Tossige-Gomes, R. *et al.* Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Med. E Biol.* **47**, 492–498 (2014).
23. Zheng, C., Chen, X.-K. & Zhou, Y. Acute glutamine ingestion modulates lymphocytic responses to exhaustive exercise in the heat. *Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab.* **43**, 213–220 (2018).
24. Gonzalez, S. M., Taborda, N. A. & Rugeles, M. T. Role of different subpopulations of CD8+ T cells during HIV exposure and infection. *Front. Immunol.* **8**, 936 (2017).
25. Gruener, N. H. *et al.* Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J. Virol.* **75**, 5550–5558 (2001).
26. Spielmann, G. *et al.* The effects of age and latent cytomegalovirus infection on the redeployment of CD8+ T cell subsets in response to acute exercise in humans. *Brain. Behav. Immun.* **39**, 142–151 (2014).
27. Kunz, H. E. *et al.* A single exercise bout augments adenovirus-specific T-cell mobilization and function. *Physiol. Behav.* **194**, 56–65 (2018).
28. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 685–705 (2013).
29. O'Rourke, A. M. & Mescher, M. F. The roles of CD8 in cytotoxic T lymphocyte function. *Immunol. Today* **14**, 183–188 (1993).
30. Smith, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* **240**, 1169–1176 (1988).
31. Tard, C., Rouxel, O. & Lehuen, A. Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomed. J.* **38**, 484–495 (2015).
32. Touch, S., Clément, K. & André, S. T cell populations and functions are altered in human obesity and type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **17**, 81 (2017).
33. Kurioka, A. *et al.* MAIT cells are licensed through granzyme exchange to kill bacterially sensitized targets. *Mucosal Immunol.* **8**, 429–440 (2015).
34. Meierovics, A., Yankelevich, W.-J.C. & Cowley, S. C. MATT cells are critical for optimal mucosal immune responses during in vivo pulmonary bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E3119–3128 (2013).
35. Treiner, E. *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–169 (2003).
36. Hinks, T. S. C. Mucosal-associated invariant T cells in autoimmunity, immune-mediated diseases and airways disease. *Immunology* **148**, 1–12 (2016).
37. Salou, M., Franciszkiewicz, K. & Lantz, O. MATT cells in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* **48**, 7–14 (2017).
38. Hiejima, E. *et al.* Reduced numbers and proapoptotic features of mucosal-associated invariant T cells as a characteristic finding in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 1529–1540 (2015).
39. Braza, M. S. & Klein, B. Anti-tumour immunotherapy with V γ 9V δ 2 T lymphocytes: from the bench to the bedside. *Br. J. Haematol.* **160**, 123–132 (2013).
40. Girardi, M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 25–31 (2006).
41. Brown, F. E. *et al.* T-lymphocyte populations following a period of high volume training in female soccer players. *Physiol. Behav.* **152**, 175–181 (2015).
42. Koay, H.-F. *et al.* A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat. Immunol.* **17**, 1300–1311 (2016).
43. Bonneville, M., O'Brien, R. L. & Born, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 467–478 (2010).
44. Paquin-Proulx, D. *et al.* MAIT cells are reduced in frequency and functionally impaired in human T lymphotropic virus type 1 infection: Potential clinical implications. *PLoS ONE* **12**, e0175345 (2017).
45. Dias, J. *et al.* The CD4-CD8- MAIT cell subpopulation is a functionally distinct subset developmentally related to the main CD8+ MAIT cell pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E11513–E11522 (2018).
46. Novak, J., Dobrovolsky, J., Novakova, L. & Kozak, T. The decrease in number and change in phenotype of mucosal-associated invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. *Scand. J. Immunol.* **80**, 271–275 (2014).
47. Pistillo, M. *et al.* The effects of age and viral serology on $\gamma\delta$ T-cell numbers and exercise responsiveness in humans. *Cell. Immunol.* **284**, 91–97 (2013).
48. Croudace, J. E. *et al.* Identification of distinct human invariant natural killer T-cell response phenotypes to alpha-galactosylceramide. *BMC Immunol.* **9**, 71 (2008).
49. Pedersen, B. K. & Bruunsgaard, H. How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med. Auckl. NZ* **19**, 393–400 (1995).
50. Batatinha, H. A. P., Biondo, L. A., Lira, F. S., Castell, L. M. & Rosa-Neto, J. C. Nutrients, immune system, and exercise: where will it take us?. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif.* **61**, 151–156 (2019).
51. Tiernan, C., Lyons, M., Comyns, T., Nevill, A. M. & Warrington, G. Salivary IgA as a predictor of upper respiratory tract infections and relationship to training load in elite rugby union players. *J. Strength Cond. Res.* **34**, 782–790 (2019).
52. West, N. P. *et al.* Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **33**, 581–587 (2014).
53. West, N. P. *et al.* Supplementation with a single and double strain probiotic on the innate immune system for respiratory illness. *E-SPEN J.* **9**, e178–e184 (2014).
54. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).

Acknowledgements

The São Paulo Research Foundation (FAPESP) Grant Nos. 2016/10561-8, 2019/09854-9 Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES), National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ).

Author contributions

Designed the study: J.C.R.-N.; R.T.-S.; A.H.L.J.; H.B.; E.T.-S. and G.S.F.L. Conducted the research: H.B.; E.T.-S.; G.S.F.L.; A.S.R. and J.A.T. Albuquerque; Provided essential reagents or materials: C.A.; R.A.F.; F.S.L.; R.T.-S.; A.H.L.J. and J.C.R.-N. Analyzed the data or performed statistical analysis: H.B.; E.T.-S. and G.S.F.L. Wrote the paper: H.B. Review, make comments and alterations: K.K., R.T.-S. and J.C.R.-N. Primarily responsible for the final content: H.B. and J.C.R.-N.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75464-0>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Apêndice B – Modelo do Termo de consentimento Livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Efeitos da suplementação de probióticos na modulação da microbiota oral e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância.

Convidamos o sr. a participar do Projeto de Pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa. Sua participação neste estudo será de muita importância para nós.

Caso o sr. não queira participar ou desista a qualquer momento, não te causará nenhum prejuízo, ou seja, sua participação é voluntária e espontânea.

Estou ciente que:

O estudo é de importância para que possam investigar as possíveis causas das infecções do trato respiratório superior, bem como um tratamento mais apropriado e eficaz;

Caso aceite, deverei participar de uma prova de maratona (42km) a ser realizada em data e local marcados.

Poderá ser solicitado que eu faça o uso de suplementação de probióticos por um período de até 30 dias. A suplementação será fornecida pelos pesquisadores de forma gratuita e não causará nenhum prejuízo à saúde.

Haverá coleta de 30ml de sangue do antebraço e coleta de saliva em três momentos diferentes, 48 horas antes da realização da prova de maratona, na qual eu deverei comparecer ao laboratório; 1 hora após a prova de maratona e 48 horas após, na qual eu deverei comparecer novamente no laboratório.

Antes da realização da maratona, um médico cardiologista do hospital universitário da USP avaliará minha condição física, para garantir minha segurança na realização do protocolo. Esses testes não causam dor e não têm risco associado.

Poderei ser convidado a realizar outro exame. Nesse exame o pesquisador estuda minha composição corporal (quantidade e musculo e gordura presente no corpo). O exame não causa desconforto.

As coletas realizadas, de sangue, saliva e os exames de composição corporal e a avaliação cardiorrespiratória servirão para o entendimento e estudo das infecções e poderão ajudar na busca de tratamento.

Estou ciente de que, apesar de não ser comum, a suplementação pode causar desconforto intestinal e a coleta de sangue pode gerar hematomas locais.

Eu não terei qualquer despesa financeira com relação a realização da prova de maratona e a suplementação de probióticos. Estas serão totalmente fornecidos pelo grupo de pesquisadores.

Eu tenho conhecimento de que não receberei nenhuma compensação financeira por participação do estudo, entretanto as estruturas necessárias para realização da prova de maratona e a suplementação serão devidamente providenciadas.

Eu tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem-estar físico.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas eu concordo sejam divulgados em publicações científicas (resumos de congressos, livros e artigos de periódicos científicos), desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

O material coletado poderá ser armazenado em soluções específicas para cada técnica, em freezer - 80º, para manter a integridade das amostras e posterior utilização, sempre dentro da mesma linha de pesquisa;

Poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa;

- () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

A qualquer momento, poderei entrar em contato com os pesquisadores responsáveis pelo telefone 3091-0883, ou com a Comissão de Ética em Experimentos com seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, órgão que avalia a realização de pesquisas com pessoas e garantem que a pesquisa da qual participo seja de importância clínica e/ou científica e que está sendo conduzida de forma apropriada. O telefone, email e endereço dessa comissão está no fim desse documento, que será emitido em 2 vias, para que eu tenha uma cópia.

O pesquisador responsável por este projeto é o Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto. E-mail: josecesar23@hotmail.com

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na, telefone)

_____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido (a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado (a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário (a) do estudo ***“Efeitos da suplementação de probióticos na modulação da microbiota oral e por consequência nas infecções do trato respiratório superior em corredores de longa distância.”***

“CONCORDO, APÓS CONVENIENTEMENTE ESCLARECIDO PELO PESQUISADOR E TER ENTENDIDO O QUE ME FOI EXPLICADO, EM PARTICIPAR DA PRESENTE PESQUISA”.

São Paulo, _____ de _____ de 20__

() Participante da pesquisa _____

Testemunha 1: _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Profª Dr. José Cesar Rosa Neto

Instituto de Ciências Biomédicas I

Telefone: 3091-0883

Identificação do CEESH-ICB/USP:

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - Cidade Universitária – Butantã, São Paulo – SP, CEP 05508-900, telefone: 3091-7733, e-mail: cep@icb.usp.br (funcionamento - 8h às 12h e das 14h às 17h)

ANEXOS

Anexo A – Publicações, como primeira autora, realizadas durante o doutorado (2016-2021)

Batatinha HAP, Krüger K, Rosa Neto JC. Thromboinflammation and COVID-19: The Role of Exercise in the Prevention and Treatment. *Front Cardiovasc Med.* 2020 Dec 18;7:582824. doi: 10.3389/fcvm.2020.582824. PMID: 33392268; PMCID: PMC7775570.



Thromboinflammation and COVID-19: The Role of Exercise in the Prevention and Treatment

Helena Angelica Pereira Batatinha¹, Karsten Krüger² and José Cesar Rosa Neto^{1*}

¹ Immunometabolism Research Group, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Department of Exercise Physiology and Sports Therapy, University of Giessen, Giessen, Germany

Keywords: COVID-19, exercise, pandemic, thromboinflammation, cytokine storm

INTRODUCTION

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is currently the biggest public health concern across the globe. On a global scale, from December 2019 to September 2020, more than 34,114,000 people were infected with the disease, with 1,016,000 deaths recorded (1). Although the etiology of the disease has long been investigated, it is still a harsh challenge for the medical and scientific community.

COVID-19 infection is complex, and the risk factors are different from the known viral respiratory infections. People with chronic inflammatory diseases (such as obesity, hypertension, diabetes, and cardiovascular disorder) are at a huge risk of developing moderate to severe symptoms and being hospitalized in the intensive care unit (ICU) (2, 3). The most common phenomena among these conditions are chronic low-grade inflammation and increased cardiovascular complications. Several evidences have been put forward to support the association between COVID-19 and thromboinflammation (3, 4). Specifically, venous thrombosis has been found to be causally related to pulmonary embolism in many cases (5).

Exercise is well-known for having a prophylactic and therapeutic effect on chronic inflammatory diseases, with a high impact on the vascular system. Furthermore, it has been reported that exercise may decrease the severity of infectious diseases and number of days of disease symptoms (6). Consistent with this, it is speculated that regular exercise represents a protective factor against the severity of COVID-19 relating to thromboinflammation and its complications.

OPEN ACCESS

Edited by:

Hendrik Tevaearai Stahel,
Bern University Hospital, Switzerland

Reviewed by:

Daniel Duerschmied,
University of Freiburg, Germany
Snehl Dixit,
King Khalid University, Saudi Arabia

*Correspondence:

José Cesar Rosa Neto
josecesar23@hotmail.com

Batatinha H, Tavares-Silva E, Leite GSF, Resende AS, Albuquerque JAT, Arslanian C, Fock RA, Lancha AH Jr, Lira FS, Krüger K, Thomatieli-Santos R, Rosa-Neto JC. Probiotic supplementation in marathonists and its impact on lymphocyte population and function after a marathon: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Sci Rep.* 2020 Nov 2;10(1):18777. doi: 10.1038/s41598-020-75464-0. PMID: 33139757; PMCID: PMC7608678.

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

 Check for updates

OPEN Probiotic supplementation in marathonists and its impact on lymphocyte population and function after a marathon: a randomized placebo-controlled double-blind study

Helena Batatinha^{1,9,✉}, Edgar Tavares-Silva², Geovana S. F. Leite³, Ayane S. Resende³, José A. T. Albuquerque⁴, Christina Arslanian⁴, Ricardo A. Fock⁵, Antônio H. Lancha Jr³, Fabio S. Lira⁶, Karsten Krüger⁷, Ronaldo Thomatieli-Santos^{2,8} & José C. Rosa-Neto¹

Probiotic supplementation arises as playing an immune-stimulatory role. High-intensity and -volume exercise can inhibit immune cell function, which threatens athletic performance and recovery. We hypothesized that 30 days of probiotic supplementation could stabilize the immune system of athletes preventing immune suppression after a marathon race. Twenty-seven male marathonists were double-blinded randomly into probiotic (*Bifidobacterium-animalis*-subsp.-*Lactis* (10×10^9) and *Lactobacillus-Acidophilus* (10×10^9) + 5 g of maltodextrin) and placebo (5 g of maltodextrin) group. They received 30 sachets and supplemented 1 portion/day during 30 days before the race. Blood were collected 30 days before (rest), 1 day before (pre), 1 h after (post) and 5 days after the race (recovery). Both chronic and acute exercise modulated a different T lymphocyte population (CD3⁺CD4⁻CD8⁻ T-cells), increasing pre-race, decreasing post and returning to rest values at the recovery. The total number of CD8 T cell and the memory subsets statistically decreased only in the placebo group post-race. Pro-inflammatory cytokine production by stimulated lymphocytes decreased in the probiotic group after the supplementation period. 30 days of probiotic supplementation maintained CD8 T cell and effector memory cell population and played an immunomodulatory role in stimulated lymphocytes. Both, training and marathon modulated a non-classical lymphocyte population regardless of probiotic supplementation.

Batatinha HAP, Diniz TA, de Souza Teixeira AA, Krüger K, Rosa-Neto JC. Regulation of autophagy as a therapy for immunosenescence-driven cancer and neurodegenerative diseases: The role of exercise. *J Cell Physiol.* 2019 Feb 12. doi: 10.1002/jcp.28318. Epub ahead of print. PMID: 30756377.

Received: 26 September 2018 | Revised: 26 December 2018 | Accepted: 10 January 2019
DOI: 10.1002/jcp.28318



REVIEW ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Physiology*

Regulation of autophagy as a therapy for immunosenescence-driven cancer and neurodegenerative diseases: The role of exercise

Helena Angelica Pereira Batatinha¹ | Tiego Aparecido Diniz¹ |
Alexandre Abilio de Souza Teixeira¹ | Karsten Krüger² | Jose Cesar Rosa-Neto¹

¹Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil

²Department Exercise and Health, Institute of Sports Science, Leibniz University Hannover, Hannover, Germany

Correspondence

Jose Cesar Rosa Neto, Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, 1524, Prof Lineu Prestes Av. Sao Paulo, SP 05508-000, Brazil.
Email: josecesar23@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2016/10561-8; Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), Grant/Award Number: 2016/01409-8

Abstract

Aging is one of the risk factors for the development of low-grade inflammation morbidities, such as several types of cancer and neurodegenerative diseases, due to changes in the metabolism, hormonal secretion, and immunosenescence. The senescence of the immune system leads to improper control of infections and tissue damage increasing age-related diseases. One of the mechanisms that maintain cellular homeostasis is autophagy, a cell-survival mechanism, and it has been proposed as one of the most powerful antiaging therapies. Regular exercise can reestablish autophagy, probably through AMP-activated protein kinase activation, and help in reducing the age-related senescence diseases. Therefore, in this study, we discuss the effects of exercise training in immunosenescence and autophagy, preventing the two main age-related disease, cancer and neurodegeneration.

KEYWORDS

autophagy, cancer, exercise, immunosenescence, neurodegeneration

Batatinha HAP, Rosa Neto JC, Krüger K. Inflammatory features of obesity and smoke exposure and the immunologic effects of exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2019;25:96-111. PMID: 30753132.

96 • Exercise in obesity and smoke immunoregulation

Inflammatory features of obesity and smoke exposure and the immunologic effects of exercise

Helena Angelica Pereira Batatinha¹, Jose Cesar Rosa Neto¹, Karsten Krüger²

¹ Immunometabolism Research Group, Department of Cell Biology and Development, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

² Department of Exercise and Health, Institute of Sports Science, Leibniz University of Hannover, Hannover, Germany.

ABSTRACT

Many lifestyle-related diseases, such as obesity and cigarette smoke-induced pulmonary morbidities, are associated with chronic systemic inflammation, which has been shown to contribute to the disease initiation and progression, and also for co-morbidities of these diseases. While the source of inflammation in obese subjects is suggested to be mainly the visceral adipose tissue, smoke-induced inflammation originates in the pulmonary system. Here, chronic cigarette smoking induces oxidative stress, resulting in severe cellular damage. During obesity, metabolic stress pathways in adipocytes induce inflammatory cascades which are also accompanied by fibrotic processes and insulin resistance. In both diseases, local inflammatory signals induce progressive immune cell infiltration, release of cytokines and a subsequent spill-over of inflammation to the systemic circulation. Exercise training represents an effective therapeutic and immune regulating strategy for both obese patients, as well as for patients with smoke induced pulmonary inflammation. While the immune-regulating impact of exercise might primarily depend on the disease state, patients with pulmonary inflammation seem to be less responsive to exercise therapy. The current review tries to identify similarities and differences between inflammatory processes, and the consequences for the immunoregulatory effects of exercise as a therapeutic agent.

1. INTRODUCTION

Many lifestyle-related diseases—such as diabetes type II, coronary heart disease (CHD), cancer, obesity or chronic obstructive pulmonary disease (COPD)—are associated with chronic systemic inflammation. Beyond mutual association, systemic inflammatory processes have been shown to contribute to the initiation and progression of these diseases (1), and are suggested to be an important reason for their shared comorbidities. Most of these diseases share some similarities in their inflammatory genesis, while other related processes are distinctly different. A combination of two or more of these diseases has been shown to further aggravate morbidity and mortality (2). Exercise is known to be an effective treatment for most of these diseases, at least partly due to its immunoregulating properties (3).

In this regard, it has been shown that patients with specific diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), are less responsive to exercise therapy compared with other diseases, such as obesity (4). However, until now, there are few data available to prescribe different exercise guidelines for specific disease conditions characterized by a dysregulated immune system. In order to better understand the inflammatory pathophysiological genesis of lifestyle-related diseases, the current review tries to compare the inflammatory processes at work in two examples of highly

Batatinha HAP, Biondo LA, Lira FS, Castell LM, Rosa-Neto JC. Nutrients, immune system, and exercise: Where will it take us? *Nutrition*. 2019 May;61:151-156. doi: 10.1016/j.nut.2018.09.019. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30711864.

Nutrition 61 (2019) 151–156



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrnal.com



Review article

Nutrients, immune system, and exercise: Where will it take us?

Helena A.P. Batatinha^a, Luana A. Biondo^a, Fabio S. Lira^b, Linda M. Castell^c,
José C. Rosa-Neto Ph.D.^{a,*}



^a Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Exercise and Immunometabolism Research Group, Postgraduation Program in Movement Sciences, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente, Brazil

^c Green Templeton College, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article History:
Received 9 July 2018
Accepted 29 September 2018

Keywords:
Immune system
Metabolism
Exercise
Glucose
Glutamine

ABSTRACT

The immune system plays a key role in controlling infections, repairing injuries, and restoring homeostasis. Immune cells are bioenergetically expensive during activation, which requires a tightly regulated control of the metabolic pathways, which is mostly regulated by two cellular energy sensors: Adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin. The activation and inhibition of this pathways can change cell subtype differentiation. Exercise intensity and duration and nutrient availability (especially glucose and glutamine) tightly regulate immune cell differentiation and function through Adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin signaling. Herein, we discuss the innate and adaptive immune-cell metabolism and how they can be affected by exercise and nutrients.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo B – Publicações, como colaboradora, realizadas durante o doutorado (2016-2021)

Antunes BM, Rosa-Neto JC, **Batatinha HAP**, Franchini E, Teixeira AM, Lira FS. Physical fitness status modulates the inflammatory proteins in peripheral blood and circulating monocytes: role of PPAR-gamma. *Sci Rep.* 2020 Aug 24;10(1):14094. doi: 10.1038/s41598-020-70731-6. PMID: 32839476; PMCID: PMC7445279.

www.nature.com/scientificreports

**SCIENTIFIC
REPORTS**

nature research



OPEN

Physical fitness status modulates the inflammatory proteins in peripheral blood and circulating monocytes: role of PPAR-gamma

Barbara Moura Antunes^{1,2}, José Cesar Rosa-Neto², Helena Angélica Pereira Batatinha², Emerson Franchini³, Ana Maria Teixeira⁴ & Fábio Santos Lira¹

The aim of this study was to analyze the metabolic and molecular profile according to physical fitness status (Low or High VO_{2max}) and its impacts on peripheral and cellular inflammatory responses in healthy men. First (*Phase I*), inflammatory profile (TNF- α , IL-6, IL-10) was analyzed at baseline and post-acute exercise sessions performed at low (< 60% VO_{2max}) and high (> 90% VO_{2max}) intensities considering the individual endotoxin concentrations. Next (*Phase II*), monocyte cell cultures were treated with LPS alone or associated with Rosiglitazone (PPAR- γ agonist drug) to analyze cytokine production and gene expression. Monocyte subsets were also evaluated by flow cytometry. A positive relationship was observed between LPS concentrations and oxygen uptake (VO_{2max}) ($r = 0.368$; $p = 0.007$); however, in the post-exercise an inverse correlation was found between LPS variation ($\Delta\%$) and VO_{2max} ($r = -0.385$; $p = 0.004$). With the low-intensity exercise session, there was inverse correlation between LPS and IL-6 concentrations post-exercise ($r = -0.505$; $p = 0.046$) and a positive correlation with IL-10 in the recovery (1 h post) ($r = 0.567$; $p = 0.011$), whereas with the high-intensity exercise an inverse correlation was observed with IL-6 at pre-exercise ($r = -0.621$; $p = 0.013$) and recovery ($r = -0.574$; $p = 0.016$). When monocyte cells were treated with LPS, High VO_{2max} individuals showed higher PPAR- γ gene expression whereas Low VO_{2max} individuals displayed higher IL-10 production. Additionally, higher TLR-4, IKK1, and PGC-1 α gene expression were observed in the High VO_{2max} group than Low VO_{2max} individuals. In conclusion, even with elevated endotoxemia, individuals with High VO_{2max} exhibited higher IL-6 concentration in peripheral blood post-acute aerobic exercise and lower IL-10 concentration during recovery (1 h post-exercise). The anti-inflammatory effects linked with exercise training and physical fitness status may be explained by a greater gene expression of IKK1, TLR-4, and PGC-1 α , displaying an extremely efficient cellular framework for the PPAR- γ responses.

Gerosa-Neto J, Monteiro PA, Inoue DS, Antunes BM, **Batatinha H**, Dorneles GP, Peres A, Rosa-Neto JC, Lira FS. High- and moderate-intensity training modify LPS-induced ex-vivo interleukin-10 production in obese men in response to an acute exercise bout. *Cytokine*. 2020 Dec;136:155249. doi: 10.1016/j.cyto.2020.155249. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32829109.

Cytokine 136 (2020) 155249



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



High- and moderate-intensity training modify LPS-induced *ex-vivo* interleukin-10 production in obese men in response to an acute exercise bout



José Gerosa-Neto^{a,b,1}, Paula Alves Monteiro^{a,1}, Daniela Sayuri Inoue^a, Barbara Moura Antunes^a, Helena Batatinha^c, Gilson Pires Dorneles^d, Alessandra Peres^d, José Cesar Rosa-Neto^c, Fabio Santos Lira^{b,*}

^a Exercise and Immunometabolism Research Group, Post graduation Program in Movement Sciences, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil

^b Physical Education, Physiotherapy, University Center of Maringa (UnicEsamar), Parana, Brazil

^c Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

^d Department of Health Basic Science, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Isoenergetic training
Short-term training
Aerobic training
Anti-inflammatory

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the inflammatory (peripheral and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated released from whole blood) and metabolic (glucose and insulin) profile of inactive obese men in response to two isoenergetic models of aerobic exercise training (~300 kcal each exercise session). Twenty-two participants (28.7 ± 1.6 years; BMI = 34.4 ± 0.1 kg/m²) were randomized into two groups: I) HIIT: high-intensity interval training (10 × 1 bout: 1 min – 100% Maximal Aerobic Velocity) or II) MICT: moderate-intensity continuous training (65% Maximal Aerobic Velocity; kcal equal to HIIT). Both groups trained three times per week for 6-weeks. Fasting blood samples were collected before and 0, 30, and 60 min after exercise during the first and last training sessions for evaluation of: I) MIP-1α, insulin, glucose, visceral and subcutaneous fat depots, oral glucose tolerance test, and homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index; II) Peripheral (TNF-α, IL-6, and IL-10) and LPS-stimulated release of TNF-α and IL-10 were analyzed before, 0, and 60 min after sessions. IL-6 concentration remained elevated up to 60-min after the acute exercise session ($p < 0.001$), and IL-10 concentration was higher after 30 and 60-min ($p = 0.001$) compared to rest, independent of training period and protocol. AUC of IL-10 presented effect of type of training ($p = 0.023$) with MICT group showed significantly higher values than the HIIT. The *ex-vivo* assay showed higher IL-10 secretion in response to LPS immediately ($p = 0.003$) after both acute MICT and HIIT exercise sessions, independent of training period. Fifteen subjects presented decreased HOMA-IR after 6-weeks and seven presented an increase in this index. When we excluded the two least responsive subjects, it was possible to observe a decrease in HOMA-IR ($p = 0.020$) after training. Taken together, our results suggest that both HIIT and MICT (with same energy expenditure) promote similar effects on HOMA-IR and led to elevations in IL-10 production in LPS-stimulated whole blood, suggesting that leukocytes had an enhanced ability to secrete anti-inflammatory cytokines after the exercise bout.

Teixeira AAS, Biondo LA, Silveira LS, Lima EA, **Batatinha HA**, Diniz TA, Oliveira De Souza C, Comin J, Neto JCR. Doxorubicin modulated clock genes and cytokines in macrophages extracted from tumor-bearing mice. *Cancer Biol Ther*. 2020 Apr 2;21(4):344-353. doi: 10.1080/15384047.2019.1702400. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31931676; PMCID: PMC7515505.

CANCER BIOLOGY & THERAPY
2020, VOL. 21, NO. 4, 344-353
<https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1702400>



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS Check for updates

Doxorubicin modulated clock genes and cytokines in macrophages extracted from tumor-bearing mice

Alexandre Abilio S. Teixeira , Luana Amorim Biondo , Loreana S. Silveira , Edson A. Lima ,
Helena A. Batatinha , Tiego A. Diniz , Camila Oliveira De Souza , Jeferson Comin , and José Cesar Rosa Neto

Institute of BiomedicalSciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Circadian rhythm is essential for cellular regulation of physiological, metabolic, and immune functions. Perturbations of circadian rhythms have been correlated with increased susceptibility to cancer and poor prognosis in the cancer treatment. Our aim is to investigate the role of doxorubicin (DOX) treatment on clock genes expression and inflammation in intraperitoneal macrophages and the anti-tumoral response. Methods: Macrophages were extracted from intraperitoneal cavity of mice without or with Lewis lung carcinoma (LLC) and treated with DOX totaling four groups (CTL, LLC, LLC+DOX and DOX) and analyzes of clock genes in six time points (ZT02, ZT06, ZT10, ZT14, ZT18 AND ZT22). Intraperitoneal macrophages cell culture was stimulated with LPS and DOX and clock genes and inflammatory profile were analyzed. In tumor were analyzed macrophages markers. Results: The expression of F4/80 (ZT22) and CD11c (ZT06) tumor tissue was significantly differed between LLC and LCC +DOX groups. In the intraperitoneal macrophages, DOX increased Clock (ZT10), Rev-Erba (ZT18 and ZT22) and Per2 expressions (ZT18); in the LLC+DOX group was increased Bmal1 (ZT10), Per2 (ZT18) and NF-κB (ZT22) expressions; IL-6 expression increased in the LCC group (ZT02). In intraperitoneal macrophages cell culture stimulated with DOX and LPS after 24 h decreased Clock and Per1. DOX causes depression after 6 and 24 h in TNF-α content and Per2 gene expression after 24 h IL-1β expression was reduced also. Conclusion: DOX treatment in vivo disrupted cytokine and clock genes expression in intraperitoneal macrophages suppressing immune response. Moreover, macrophages cultured with DOX had decreased expression of LPS-stimulated inflammatory cytokines.

ARTICLE HISTORY

Received 20 May 2019
Revised 10 October 2019
Accepted 1 December 2019

KEYWORDS

Immune cell; circadian rhythms; chemotherapy; cancer; cytokines

Silveira LS, **Batatinha HAP**, Castoldi A, Câmara NOS, Festuccia WT, Souza CO, Rosa Neto JC, Lira FS. Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors γ deletion in macrophages. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):5241-5251. doi: 10.1002/jcp.27333. Epub 2018 Sep 21. PMID: 30238979.

Received: 13 March 2018 | Accepted: 10 August 2018

DOI: 10.1002/jcp.27333



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

WILEY *Journal of Cellular Physiology*

Exercise rescues the immune response fine-tuned impaired by peroxisome proliferator-activated receptors γ deletion in macrophages

Loreana Sanches Silveira^{1,2} | Helena Angélica Pereira Batatinha² | Angela Castoldi³ | Niels Olsen Saraiva Câmara³ | Willian T. Festuccia⁴ | Camila Oliveira Souza² | José Cesar Rosa Neto² | Fábio Santos Lira¹

¹Department of Physical Education, Exercise and Immunometabolism Research Group, Post-Graduation Program in Movement Sciences, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil

²Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

³Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Correspondence

José Cesar Rosa-Neto, Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), Av. Lineu Prestes, 1524-lab.435, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.
Email: josecesar23@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2014/01246-6, 2013/25310-2, 2016/01409-8

Abstract

Background: Exercise is a powerful tool for prevention and treatment of many conditions related to the cardiovascular system and also chronic low-grade inflammation. Peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) exerts an important role on the regulation of metabolic profile and subsequent inflammatory response, especially in macrophages.

Purpose: To investigate the effects of 8-week moderate-exercise training on metabolic and inflammatory parameters in mice with PPAR γ deficiency in myeloid cells.

Methods: Twelve-week old mice bearing PPAR γ deletion exclusively in myeloid cells (PPAR γ lox/lox Lys Cre^{+/+}, knockout [KO]) and littermate controls (PPAR γ lox/lox Lys Cre^{-/-}, wild type [WT]) were submitted to 8-week exercise training (treadmill running at moderate intensity, 5 days/week). Animals were evaluated for food intake, glucose homeostasis, serum metabolites, adipose tissue and peritoneal macrophage inflammation, and basal and stimulated cytokine secretion.

Results: Exercise protocol did not improve glucose metabolism or adiponectin concentrations in serum of KO mice. Moreover, the absence of PPAR γ in macrophages exacerbated the proinflammatory profile in sedentary mice. Peritoneal cultured cells had higher tumor necrosis factor- α (TNF- α) secretion in nonstimulated and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated conditions and higher Toll-4 receptor (TLR4) gene expression under LPS stimulus. Trained mice showed reduced TNF- α content in adipose tissue independently of the genotype. M2 polarization ability was impaired in KO peritoneal macrophages after exercise training, while adipose tissue-associated macrophages did not present any effect by PPAR γ ablation.

Conclusion: Overall, PPAR γ seems necessary to maintain macrophages appropriate

Biondo LA, **Batatinha HA**, Souza CO, Teixeira AAS, Silveira LS, Alonso-Vale MI, Oyama LM, Alves MJ, Seelaender M, Neto JCR. Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue. *Front Pharmacol.* 2018 May 8;9:452. doi: 10.3389/fphar.2018.00452. PMID: 29867463; PMCID: PMC5952005.



Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue

Luana A. Biondo^{1*}, Helena A. Batatinha¹, Camila O. Souza¹, Alexandre A. S. Teixeira¹, Loreana S. Silveira², Maria I. Alonso-Vale², Lila M. Oyama⁴, Michele J. Alves¹, Marília Seelaender^{1,4} and José C. R. Neto^{1*}

¹ Department of Cellular and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil, ² Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brazil, ³ Department of Biological Sciences, Institute of Environmental Sciences, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, ⁴ Department of Physiology, Physiology of Nutrition Discipline, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil, ⁵ Department of Surgery, Faculty of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabrizio Mercuro,
Università degli Studi di Milano, Italy

Reviewed by:

Mehal Singh,
University of Toledo, United States
Maryna Van De Venter,
Nelson Mandela University,
South Africa

*Correspondence:

Luana A. Biondo:
luabiondo@gmail.com
José C. R. Neto:
josacrs23@hotmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 24 January 2018

Accepted: 18 April 2018

Published: 08 May 2018

Citation:

Biondo LA, Batatinha HA, Souza CO, Teixeira AAS, Silveira LS, Alonso-Vale MI, Oyama LM, Alves MJ, Seelaender M and Neto JCR (2018) Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue. *Front. Pharmacol.* 9:452. doi: 10.3389/fphar.2018.00452

Doxorubicin (DX) is a chemotherapeutic drug that is used in clinical practice that promotes deleterious side effects in non-tumor tissues such as adipose tissue. We showed that DX leads to extensive damage in adipose tissue via a disruption in 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and PPAR-gamma signaling. Thus, we investigated whether co-treatment with the biguanide drug metformin (MET) could prevent the side effects of DX through the activation of AMPK in adipose tissue. The goal of the present study was to verify the effects of DX and adjuvant MET treatment in subcutaneous adipose tissue (SAT) and to determine whether MET could protect against chemotherapy-induced side effects. C57/BL6 mice received DX hydrochloride (2.5 mg/kg) intraperitoneally 2 times per week for 2 weeks (DX), concomitantly or not, with MET administration (300 mg/kg oral daily) (DX + MET). The control group (CTRL) was pair-fed according to the food consumption of the DX group. After euthanasia, adipose tissue fat pads were collected, and SAT was extracted so that adipocytes could be isolated. Glucose uptake was then measured, and histological, gene, and protein analyses were performed. One-way analysis of variance was also performed, and significance was set to 5%. DX reduced retroperitoneal fat mass and epididymal pads and decreased glycemia. In cultured primary subcutaneous adipocytes, mice in the DX group had lower glucose uptake when stimulated with insulin compared with mice in the CTRL group. Adipocytes in the DX group exhibited a reduced area, perimeter, and diameter; decreased adiponectin secretion; and decreased fatty acid synthase gene expression. SAT from MET-treated mice also showed a reduction in collagen deposition. Treatment with MET prevented fibrosis and restored glucose uptake in SAT after insulin stimulation, yet the drug was unable to prevent other side effects of DX such as tissue loss and inflammatory response.

Keywords: doxorubicin, adipose tissue, metformin, fibrosis, chemotherapy, glucose

de Souza Teixeira AA, Souza CO, Biondo LA, Sanches Silveira L, Lima EA, **Batatinha HA**, Araujo AP, Alves MJ, Hirabara SM, Curi R, Neto JCR. Short-term treatment with metformin reduces hepatic lipid accumulation but induces liver inflammation in obese mice. *Inflammopharmacology*. 2018 Aug;26(4):1103-1115. doi: 10.1007/s10787-018-0443-7. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29450671.

Inflammopharmacology
<https://doi.org/10.1007/s10787-018-0443-7>

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



Short-term treatment with metformin reduces hepatic lipid accumulation but induces liver inflammation in obese mice

Alexandre Abilio de Souza Teixeira¹ · Camila O. Souza¹ · Luana A. Biondo¹ · Loreana Sanches Silveira² · Edson A. Lima¹ · Helena A. Batatinha¹ · Adriane Pereira Araujo¹ · Michele Joana Alves¹ · Sandro Massao Hirabara⁴ · Rui Curi^{3,4} · José Cesar Rosa Neto¹

Received: 21 November 2017 / Accepted: 12 January 2018
 © Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

The study aimed to evaluate the metabolic and inflammatory effects of short-term treatments (10 days) with metformin (MET) on the NAFLD caused by a high-fat diet (HFD) in C57BL/6 mice. After the treatment, histological liver slices were obtained, hepatocytes and macrophages were extracted and cultured with phosphate buffered saline, LPS (2.5 µg/mL) and MET (1 µM) for 24 h. Cytokine levels were determined by ELISA. NAFLD caused by the HFD was partially reduced by MET. The lipid accumulation induced by the HFD was not associated with liver inflammation; however, MET seemed to promote pro-inflammatory effects in liver, since it increased hepatic concentration of IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1 and IFN-γ. Similarly, MET increased the concentration of IL-1β, IL-6 in hepatocyte cultures. However, in macrophages culture, MET lowered levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α stimulated by LPS. Overall, MET reduced liver NAFLD but promoted hepatocyte increase in pro-inflammatory cytokines, thus, leading to liver inflammation.

Keywords Obesity · Metformin · Inflammation · Liver


Silveira LS, Pimentel GD, Souza CO, Biondo LA, Teixeira AAS, Lima EA, **Batatinha HAP**, Rosa Neto JC, Lira FS. Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR- α knockout mice. *Cell Biochem Funct.* 2017 Dec;35(8):510-517. doi: 10.1002/cbf.3308. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29063619.

Received: 31 January 2017 | Revised: 23 June 2017 | Accepted: 17 September 2017
DOI: 10.1002/cbf.3308

WILEY CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION

RESEARCH ARTICLE

Effect of an acute moderate-exercise session on metabolic and inflammatory profile of PPAR- α knockout mice

Loreana S. Silveira¹  | Gustavo D. Pimentel² | Camila O. Souza³ | Luana A. Biondo³ | Alexandre Abílio S. Teixeira³ | Edson A. Lima³ | Helena A. P. Batatinha³ | José C. Rosa Neto³ | Fábio S. Lira¹

¹Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, SP, Brazil

²Clinical and Sports Nutrition Research Laboratory (Labince), Nutrition Faculty (FANUT)—Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil

³Immunometabolism Research Group, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

Correspondence

Loreana Sanches Silveira, Exercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305, 19060-900 Presidente Prudente, SP, Brazil.
Email: loreana_loly@hotmail.com

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: 2013/04765-1, 2013/09367-4, 2013/10861-3, 2013/25310-2 and 2014/01246-6

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) play a major role in metabolism and inflammatory control. Exercise can modulate PPAR expression in skeletal muscle, adipose tissue, and macrophages. Little is known about the effects of PPAR- α in metabolic profile and cytokine secretion after acute exercise in macrophages. In this context, the aim of this study was to understand the influence of PPAR- α on exercise-mediated immune metabolic parameters in peritoneal macrophages. Mice C57BL/6 (WT) and PPAR- α knockout (KO) were examined in non-exercising control ($n = 4$) or 24 hours after acute moderate exercise ($n = 8$). Metabolic parameters (glucose, non-esterified fatty acids, total cholesterol [TC], and triacylglycerol [TG]) were assessed in serum. Cytokine concentrations (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and MCP-1) were measured from peritoneal macrophages cultured or not with LPS (2.5 μ g/mL) and Rosiglitazone (1 μ M). Exercised KO mice exhibited low glucose concentration and higher TC and TG in serum. At baseline, no difference in cytokine production between the genotypes was observed. However, IL-1 β was significantly higher in KO mice after LPS stimulus. IL-6 and IL-1 β had increased concentrations in KO compared with WT, even after exercise. MCP-1 was not restored in exercised KO LPS group. Rosiglitazone was not able to reduce proinflammatory cytokine production in KO mice at baseline level or associated with exercise. Acute exercise did not alter mRNA expression in WT mice. Conclusion: PPAR- α seems to be needed for metabolic glucose homeostasis and anti-inflammatory effect of acute exercise. Its absence may induce over-expression of pro-inflammatory cytokines in LPS stimulus. Moreover, moderate exercise or PPAR- γ agonist did not reverse this response.

KEYWORDS

acute exercise, cytokine, peritoneal macrophages, transcription factor

de Souza CO, Teixeira AAS, Biondo LA, Lima Junior EA, **Batatinha HAP**, Rosa Neto JC. Palmitoleic Acid Improves Metabolic Functions in Fatty Liver by PPAR α -Dependent AMPK Activation. J Cell Physiol. 2017 Aug;232(8):2168-2177. doi: 10.1002/jcp.25715. Epub 2017 Mar 24. PMID: 27925195.

Original Research Article

Palmitoleic acid improves metabolic functions in fatty liver by PPAR α -dependent AMPK activation[†]

Camila O. Souza¹; Alexandre A S Teixeira¹; Luana A Biondo¹; Edson A Lima Junior¹; Helena A P Batatinha¹; Jose C Rosa Neto¹

¹ Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Running title: Palmitoleate controlling PPAR α -AMPK on liver

Keywords:

- **Hepatic metabolism;**
- **Glucokinase;**
- **Monounsaturated fatty acid;**
- **High fat diet;**
- **Nonalcoholic fatty liver disease.**

Corresponding author:

Camila O Souza¹
souza.co@usp.br
+55 (11) 30910883

¹ Department of Cell and Developmental Biology, University of São Paulo, 1524, Lineu Prestes Avenue, São Paulo, SP. 05508-000. Brazil

Teixeira AA, Lira FS, Pimentel GD, Oliveira de Souza C, **Batatinha H**, Biondo LA, Yamashita AS, Junior EA, Neto JC. Aerobic Exercise Modulates the Free Fatty Acids and Inflammatory Response During Obesity and Cancer Cachexia. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2016;26(3):187-98. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016016490. PMID: 27650984.

Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression, 26(3):187–198 (2016)

Aerobic Exercise Modulates the Free Fatty Acids and Inflammatory Response During Obesity and Cancer Cachexia

Alexandre Abilio de S. Teixeira,^{a,*} Fábio S Lira,^b Gustavo D Pimentel,^c Camila Oliveira de Souza,^a Helena Batatinha,^a Luana A Biondo,^a Alex S Yamashita,^d Edson A Lima Júnior,^a & José C Rosa Neto^a

^aImmunometabolism Research Group, Department of Cell Biology and Development – Institute of Biomedical Sciences I – University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil; ^bExercise and Immunometabolism Research Group, Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP), Presidente Prudente, SP, Brazil; ^cFaculty of Nutrition – Federal University of Goiás (UFG), Goiânia, GO, Brazil; ^dDepartment of Physiology and Biophysics – Institute of Biomedical Sciences I – University of Sao Paulo (USP), São Paulo, Brazil

*Address all correspondence to: Alexandre Abilio de Souza Teixeira, Immunometabolism Research Group, Department of Cell Biology and Development – Institute of Biomedical Science – University of Sao Paulo – São Paulo – Av: 1524 Lineu prestes -São Paulo/SP – Brasil, CEP: 05508-900, Phone/Fax: 55 11 3091 0883, E-mail: alexandreast@gmail.com

ABSTRACT: White adipose tissue (WAT) is no longer considered a tissue whose main function is the storage of TAG. Since the discovery of leptin in 1994, several studies have elucidated the important role of WAT as an endocrine organ, the source of the adipokines. The low-grade inflammation observed in obese and cancer cachexia patients is explained, at least partially, by the exacerbated release of proinflammatory adipokines. Despite of the recent progress in the characterization of the various adipokines and lipokines produced by WAT, little is known about the mechanisms regulating the secretion of these molecules in different physiological and pathological circumstances. Chronic exercise is a nonpharmacological therapy employed in several chronic diseases and shows an anti-inflammatory effect through the regulation of the cytokine network. In this review, we address the potential mechanisms by which the aerobic physical exercise modulate the production and release of inflammatory adipokines, as well as the inflammation-lipolysis axis in WAT, with special focus in the therapeutic role of exercise in obesity-associated insulin resistance and cancer cachexia.

KEY WORDS: white adipose tissue, inflammation, obesity, cancer cachexia, aerobic exercise