

# DESNUTRIÇÃO PERINATAL, TREINAMENTO FÍSICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO: IMUNOHISTOQUÍMICA DE ÓRGÃOS LINFÓIDES DE RATOS ADULTOS ENDOTOXÊMICOS

Emmanuela Kethully Mota dos Santos<sup>1</sup>; José Candido de Souza Ferraz Júnior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Enfermagem- CAV – UFPE; E-mail: manukms@hotmail.com, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Educação Física e Ciência do Esporte. – CAV – UFPE. E-mail: jcferraz2009@gmail.com.

**Sumário:** A desnutrição nas fases iniciais da vida (gestação, lactação e primeira infância) pode promover alterações na estrutura e/ou funcionamento de órgãos e sistemas com repercussões na idade adulta. Dessa forma, a desnutrição pode atuar como um importante indutor de alterações morfofuncionais de órgãos linfóides com reverberações na vida adulta. A desnutrição pregressa tem sido apontada como causa de deficiência secundária na resposta aos agentes infecciosos. O timo, por exemplo, é um órgão alvo no processo de desnutrição energético-protéica. O nosso grupo tem observado que o treinamento físico moderado (65% do  $VO_{2max}$ , 60 minutos p/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas) eleva a taxa de fagocitose de macrófagos, a proliferação de linfócitos do timo, baço e linfonodos mesentéricos, e aumenta a subpopulação de linfócitos T-CD4 em ratos submetidos a estresse agudo de contenção. Nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito do treinamento físico moderado sobre a morfometria e morfologia do baço de ratos adultos endotoxêmicos que foram submetidos à desnutrição perinatal. Os resultados apontam para uma maior neutrofilia e linfopenia, aumento no número de folículos linfóides e redução na área da zona marginal esplênica dos animais desnutridos/sedentários e endotoxêmicos. Essa pesquisa, por conseguinte, verificou que a celularidade do córtex do timo mostrou que o exercício físico consegue atenuar os efeitos da desnutrição proteica perinatal.

**Palavras-chave:** exercício físico; imunologia; plasticidade fenotípica

## INTRODUÇÃO

As fases de gestação, lactação e primeira infância são caracterizadas por crescimento rápido, maturação de órgãos e sistemas sendo chamadas de período crítico do desenvolvimento. A desnutrição nessas fases iniciais da vida pode promover alterações na estrutura e/ou funcionamento de órgãos e sistemas com repercussões na idade adulta (Warner and Ozanne 2010). Neste contexto, a desnutrição nos períodos críticos do desenvolvimento parece ser um importante indutor de alterações morfofuncionais de órgãos linfóides (Schuler, Gurmini et al. 2008) com repercussões na idade adulta. Há relatos de prejuízos na função linfocitária, migração de leucócitos para sítios de infecção e diminuição da produção de citocinas (Landgraf, C. *et al.*, 2007; Cortes-Barberena, Gonzalez-Marquez *et al.*, 2008). Portanto, a desnutrição pregressa tem sido apontada como causa de deficiência secundária na resposta aos agentes infecciosos (Landgraf, Martinez *et al.*, 2005). Por exemplo, o timo, local de produção de linfócitos T, é um órgão alvo no processo de desnutrição energético-protéica (Ortiz, Cortes *et al.*, 2009). Em ratos, a desnutrição neonatal também provoca, na vida adulta, uma redução na resposta humoral e na liberação de superóxido por macrófagos (De Castro, Manhães De Castro *et al.*, 2000; Barreto-Medeiros, Queiros-Santos *et al.*, 2007). O déficit no sistema imunológico provocado pela desnutrição protéico-energética pode ser atenuado por fatores ambientais, como a prática de exercício físico (Dos Santos Cunha, Giampietro *et al.*, 2004). O estresse provocado pelo exercício físico é capaz de alterar a homeostase orgânica promovendo a

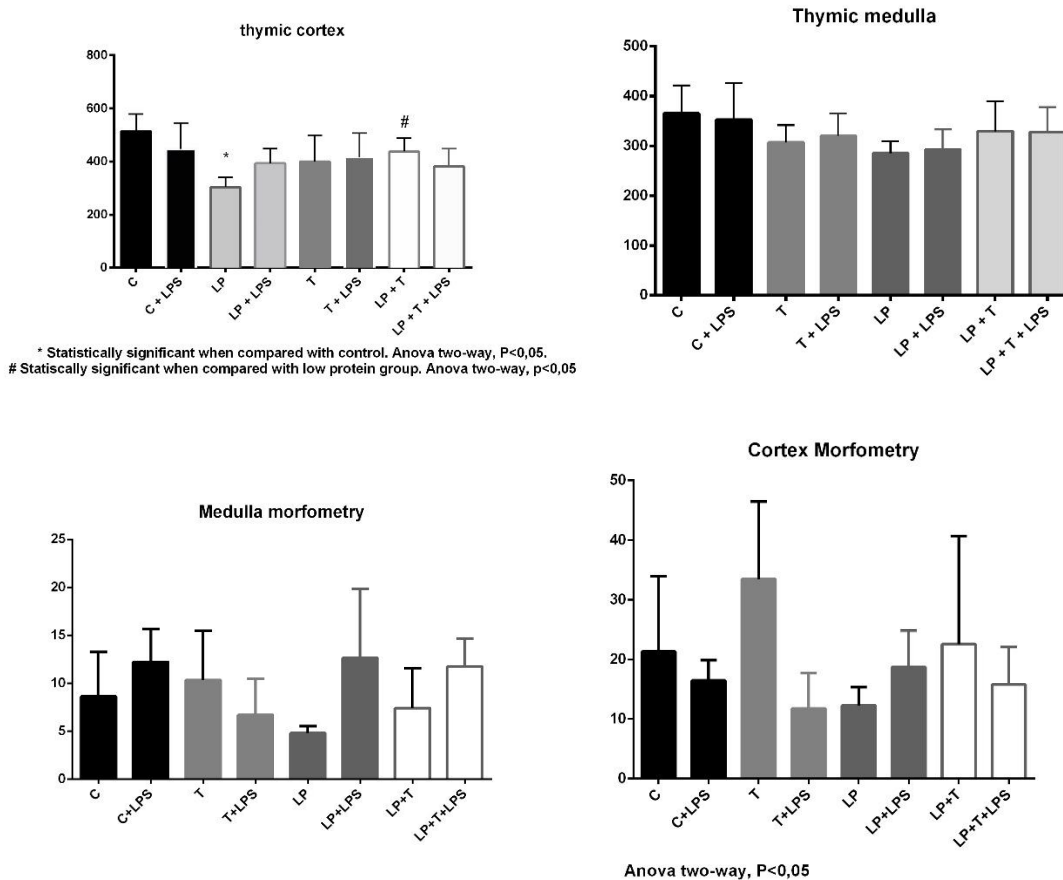
reorganização das respostas imunológicas, melhorando a função de linfócitos, macrófagos e células NK (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000; Leandro, De Lima *et al.*, 2007). Mas estas alterações positivas da resposta imunológica associadas ao exercício físico dependem da magnitude (intensidade, duração, tipo e frequência) do esforço (Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006). O nosso grupo tem observado que o treinamento físico moderado (65% do  $VO_{2max}$ , 60 minutos p/dia, 5 dias/semana, durante 8 semanas) eleva a taxa de fagocitose de macrófagos, a proliferação de linfócitos do timo, baço e linfonodos mesentéricos, e aumenta a subpopulação de linfócitos T-CD4 em ratos submetidos a estresse agudo de contenção (Leandro, Martins De Lima *et al.*, 2006; Leandro, De Lima *et al.*, 2007). Poucos estudos relacionaram os efeitos do treinamento físico moderado sobre a resposta imune de organismos adultos previamente desnutridos. Nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito do treinamento físico moderado sobre a morfometria e morfologia do baço de ratos adultos endotoxêmicos que foram submetidos à desnutrição perinatal (Moita, Lustosa *et al.*, 2011). Os resultados apontam para uma maior neutrofilia e linfopenia, aumento no número de folículos linfóides e redução na área da zona marginal esplênica dos animais desnutridos/sedentários e endotoxêmicos. Por outro lado, em animais desnutridos precocemente, mas que foram submetidos ao treinamento físico moderado, estas alterações na morfometria esplênica são atenuadas. Assim, esse estudo foi o primeiro a demonstrar que os efeitos da desnutrição perinatal podem ser modulados por fatores ambientais positivos como o treinamento físico moderado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 ratas *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE. Depois de detectada a gestação, as ratas foram divididas em dois grupos: dieta controle (C, n=10, caseína a 17%) e desnutridas (D, n=10, caseína a 8%) (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993). Na lactação, as ratas continuaram recebendo dieta experimental e a ninhada foi ajustada para 8 filhotes. No desmame (25 dias de idade) somente os filhotes machos ( $C_f$ , n=24 e  $D_f$ , n=24) permaneceram no experimento e receberam dieta equilibrada (74,5% de carboidratos, 23% de proteínas e 2,5% de lipídeos) (Labina, Purina do Brasil-Agribands, São Paulo). Aos 60 dias de idade, os grupos foram subdivididos de acordo com o protocolo de treinamento físico: controle ( $C_f$ , n=12), controle + treinamento ( $T_f$ , n=12), desnutrido ( $D_f$ , n=12) e desnutrido + treinamento ( $DT_f$ , n=12). Após o protocolo de treinamento físico, os grupos foram subdivididos de acordo com a administração de LPS ou salina: controle ( $C_f$ , n=6), controle + LPS ( $C+LPS_f$ , n=6), controle + treinamento ( $T_f$ , n=6), controle + treinamento + LPS ( $T+LPS_f$ , n=6), desnutrido ( $D_f$ , n=6), desnutrido + LPS ( $D+LPS_f$ , n=6) e desnutrido + treinamento ( $DT_f$ , n=6), desnutrido + treinamento ( $DT+LPS_f$ , n=6). **Protocolo de Treinamento Físico:** A partir de 60 dias de idade, os ratos do grupo treinado foram submetidos a um programa de treinamento físico moderado em esteira motorizada (EP-131/Insight Equipamentos, São Paulo, Brasil). O protocolo experimental de treinamento físico moderado (8 semanas, 5 dias/semana e 60 min/dia até 70% do  $VO_{2max}$ ) foi realizado de acordo com Leandro, Levada, Hirabara *et al.* (2007). O grupo não treinado permaneceu nas gaiolas. Vinte e quatro horas após o término do período de treinamento, os animais receberam injeção intraperitoneal de LPS (*Escherichia coli* serotype 0111:B4, Sigma, Brasil, 1mL/Kg de peso corporal) ou salina (0,9% de NaCl, 1 mL/Kg), sendo sacrificados 24 horas depois, através de decapitação cervical. Os animais foram pesados antes da injeção com LPS e também anteriormente ao sacrifício. **Histologia do baço, timo e linfonodos mesentéricos:** O emblocamento em parafina e cortes das peças em micrótomo foi realizado como exposto acima. A secções de 5 mm de tecido foram colocadas em lâminas de vidro cobertas com Poly-L-Lisina. Estas foram secas em estufa a 60°C por 1 hora. A desparafinização foi feita

em dois banhos de 5 minutos cada, em Histo-Clear<sup>®</sup> (National Diagnostics, USA), 100% e 95% etanol, sequencialmente. Para restringir a atividade de peroxidase endógena, as lâminas devem ser banhadas por 10 minutos em 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/metanol e então, lavadas 2x por dez minutos em PBS, à temperatura ambiente. As lâminas foram bloqueadas com 1% BSA por 15 minutos antes de aplicar o 1º anticorpo. Os marcadores CD3, CD4, CD8 e NKR-P1A foram investigados para detectar populações de linfócitos T e NK de rato. Linfócitos B foliculares foram analisados através da detecção de IgD de superfície. Linfócitos B da zona marginal (B-ZM) foram analisados pela marcação com anticorpo monoclonal HIS57. **Análise estatística dos resultados:** Testes estatísticos ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni ou o teste T de Student serão aplicados. A maioria dos resultados será apresentada como média ± erro padrão. O nível de significância será de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS



O presente estudo mostrou que no cortex, o grupo LP ( $304,40 \pm 12,98$ ) mostrou uma diminuição na celularidade quando comparado com o Grupo ( $513,80 \pm 22,89$ ) ( $p < 0.05$ ) e o grupo T ( $437,70 \pm 18,27$ ). Nos outros resultados, não apareceram resultados significativos.

## DISCUSSÃO

Estudos prévios demonstram que a desnutrição protéica perinatal relaciona-se com macrófagos peritoniais deficientes, incluindo fagocitose e funções microbicidas deficientes (Shimizu, KA, 2008) desnutrição perinatal também é responsável pela deficiente mobilização de leucócitos da medula óssea (Gu, LJ 2014). Já o timo é conhecido por ser

sensível aos efeitos da desnutrição ( Savino, Wilson *et al.* 2007), fato que corrobora os nossos resultados para a celularidade do cortex tímico. Este parece que foi sensível a desnutrição perinatal com recuperação após a aplicação de exercício físico moderado. Na literatura, temos o exercício físico moderado como responsável por causar uma imuno modulação, melhorando a resposta do sistema de defesa ( Leandro, Carol *et al.*, 2007; Barros, KM *et al.*, 2006; Lopes de Souza, S *et al.*, 2008). O presente trabalho também mostra resultado semelhante quando observamos que a celularidade do córtex timo foi atenuada nos ratos que receberam exercício físico.

## CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados da pesquisa, a celularidade do córtex do timo mostrou que o exercício físico consegue atenuar os efeitos da desnutrição proteica perinatal.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a PROPESQ /PIBIC CNPq pelo apoio; ao Prof. Dr. Candido Ferraz pela oportunidade de participar da pesquisa e ensinamentos enquanto orientador e educador e ao Mestrando Diógenes Moura pelo suporte, compreensão, dedicação e amizade; ao laboratório de Plasticidade Fenotípica UFPE-CAV, onde foram realizados experimentos.

## REFERÊNCIAS

WARNER, M.; OZANNE, S. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **Biochem. J**, v. 427, p. 333-347, 2010.

SCHULER, Sandra Lúcia et al. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 184-189, 2008.

MOITA, Luanna; TELES DE PONTES FILHO, Nicodemos Orientador. Efeitos do treinamento físico moderado sobre a morfometria do baço de ratos adultos endotoxêmicos submetidos a desnutrição perinatal. 2010.

CORTÉS, Patricio et al. Model predictive control of an inverter with output filter for UPS applications. **Industrial Electronics, IEEE Transactions on**, v. 56, n. 6, p. 1875-1883, 2009.

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

DOS SANTOS, Cunha WD et al. Exercise restores immune cell function in energy-restricted rats. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 36, n. 12, p. 2059-2064, 2004.

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