



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

PATRÍCIA CLARA PEREIRA DOS SANTOS

**REPERCUSSÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM RATAS OBESAS**

**Recife
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA**

PATRÍCIA CLARA PEREIRA DOS SANTOS

**REPERCUSSÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM RATAS OBESAS**

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

Linha de Pesquisa: Fisioterapia: Desempenho físico-funcional e qualidade de vida.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria do Amparo Andrade

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Célia M. M. B. de Castro

Recife

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

S237r Santos, Patrícia Carla Pereira dos.
Repercussões do treinamento físico moderado nos parâmetros imunológicos em ratas obesas / Patrícia Carla Pereira dos Santos. – Recife: O autor, 2012.
95 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria do Amparo Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Exercício. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Imunidade. 4. Macrófagos alveolares. I. Andrade, Maria do Amparo (Orientador). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-110)

“REPERCUSSÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO NOS
PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM RATAS OBESAS

PATRÍCIA CLARA PEREIRA DOS SANTOS

APROVADA EM : 15/03/2012

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARIA DO AMPARO ANDRADE

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a CÉLIA M. M. B. DE CASTRO

COMISSÃO ORGANIZADORA:

PROF^a DR^a KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA LAMBERTZ- FISIOTERAPIA/UFPE

PROF^a DR^a SÍLVIA REGINA ARRUDA DE MORAES- ANATOMIA/UFPE

PROF^o DR^o AMILTON DA CRUZ SANTOS- EDUCAÇÃO FÍSICA/UFPB

Visto e permitido à impressão

COORDENADOR DO PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

DEDICATÓRIA

A minha mãe pelo amor incondicional, sacrifícios, e luta para um futuro melhor.

SAUDADES

“...Que o teu amor vela por mim..”

As minhas irmãs, **Poliana, Janaína e Geórgia**, por todas as batalhas vencidas e graças alcançadas. Obrigada pela dedicação, convívio, aprendizado, paciência, amor, união e incentivo em muitos momentos. Vocês merecem!

“A grandeza não consiste em receber honras, mas merecê-las”

(Aristóteles)

Aos meus amigos, pelas palavras, apoio e solidariedade neste intenso caminho.

“...Aonde quer que eu vá, levo vocês no olhar...”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **Deus**, por todas as graças alcançadas, pela força nas adversidades e resiliência.

Aos meus pais, **Maria** (*in memoriam*), pelo amor incondicional, e **Nilson**, responsáveis pela dedicação, amor e formação. Agradeço e muito por todo o aprendizado. Amarei vocês sempre.

As minhas orientadoras, também responsáveis por esta etapa, **Maria do Amparo Andrade e Célia Maria M. B de Castro**, pela confiança e torcida.

A minha **família** (*avó, tios e primos*) pela paciência e compreensão em muitos momentos de ausência.

Aos meus amigos, **Isabella de Kássia, Simone Buonafina, Luana Valeriano, Maria Fernanda, Débora Loula, Nathália Couto, Eline Bianchi, Camila Almeida, Nataly Diniz, Thaysa, Raquel Aragão, Priscilla Bernardes, Maria da Conceição, Rebeca, Thaís, Salyne, Mayara, Romero** pelo apoio, carinho e força. Perdoem a ausência.

Ao Laboratório de Plasticidade Neuromuscular - Departamento de Anatomia e todos os seus integrantes, **Kamilla Dinah, Cybele Nery, Raíssa, Marcos, Patrícia, Deniele, Gabriel, Thayná**, e a todos que auxiliaram este trabalho. Muito obrigada.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (*LIKA*), **Karla Melo, Rosangela Rosendo, Bruno Sampaio, Thales** e demais colaboradores, pela ajuda, aprendizado e muitos experimentos ao final de semana.

À professora de bioestatística **Maria Cristina Falcão Raposo**, pela ajuda fundamental com a interpretação e análise dos diferentes dados.

Aos meus colegas de trabalho, **Leandro, Gilmara, Lilian e Isaura** por toda a compreensão, respeito e amizade em todos os momentos.

Em especial agradeço as minhas amigas-irmãs, **Maria Patrícia e Mariana Lúcia** por todo o incentivo, dedicação, amor e amizade prestados em todos os momentos.

Ao meu namorado, **Paulo Oliveira**, pelo amor, apoio e compreensão durante todo este período. Sou imensamente agradecida por tudo.

À família Oliveira, em especial à **Ceciliana, Izabela, Thaís e Matheus**, por todo o incentivo, compreensão e torcida para a realização desta etapa.

Aos colegas de turma do Mestrado em Fisioterapia – UFPE (2009): **Daphne, Márcio, Diogo, Luciana, Priscila, Luís, Larissa, Máira, Rafaela, Marcela** pelos momentos compartilhados e aprendizado. Especialmente à **Carla Daher e Vivian Passos** pela amizade, compreensão e união.

As estagiárias de pesquisa, **Vanessa Santana, Vanessa Andrade e Milka Higina**, pelo apoio, dedicação e amizade. A participação de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos que compõem o *Departamento de Fisioterapia da UFPE*, por contribuírem para a minha formação.

Às secretárias da pós-graduação, **Niége Melo e Maria Carolina Henriques**, sempre atenciosas e disponíveis.

Enfim agradeço a todos pela torcida e compreensão. Obrigada por tudo. Amo vocês.

RESUMO

Introdução: A obesidade é considerada um baixo grau de inflamação crônica, que promove alterações em diversos sistemas, dentre os quais o sistema imune pode ser afetado. O treinamento físico é uma estratégia útil para evitar o excesso de peso e prejuízo à imunidade. **Objetivo:** Investigar as alterações imunológicas relacionadas com a obesidade e analisar a repercussão do treinamento físico moderado no sistema imune. **Métodos:** Foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas que após o 21º dia pós - natal foram divididas em dois grupos, segundo o regime dietético empregado: Grupo Controle (GC) (n=16) e Grupo Obeso (GO) (n=16). Aos 60 dias pós- natal, os grupos foram subdivididos em sedentários (S) e treinados (T), formando quatro grupos: Controle-Sedentário (CS), Controle-Treinado (CT), Obeso-Sedentário (OS) e Obeso -Treinado (OT). Avaliou-se peso, gordura visceral, índice de massa corporal e série branca do sangue, seguida de coleta e análise das células dos macrófagos alveolares. *In vitro*: Na cultura dos macrófagos foram avaliados taxa de fagocitose, índice de aderência, viabilidade celular e produção de óxido nítrico. **Resultados:** Aos 105 dias pós-natal, verificamos aumento no peso corporal, IMC e gordura visceral no OS. Quanto ao comprimento naso-anal, não houve diferença entre os grupos. No sangue, a série branca apresentou aumento nos linfócitos, neutrófilos e basófilos do OT. Eosinófilos não diferiram entre os grupos. Em macrófagos alveolares, a taxa de fagocitose foi maior para os animais treinados [CT (p= 0,000) e OT (p=0,002)]. A produção de óxido nítrico estimulado com lipopolissacarídeos aumentou em animais treinados [CT (p=0,014) e OT (p=0,000)]. O índice de aderência e a viabilidade celular não diferiram entre os grupos. **Conclusão:** A dieta hiperlipídica foi eficiente em aumentar a gordura visceral, além de repercutir na resposta imune. O treinamento físico reverteu o aumento da adiposidade e proteger o organismo das agressões promovidas pela obesidade.

Palavras-chave: **dieta hiperlipídica, exercício físico, imunidade, macrófagos alveolares.**

ABSTRACT

Introduction: Obesity is considered a low-grade chronic inflammation, which causes changes in several systems, among which the immune system may be affected. Physical training is a useful strategy to prevent overweight and impaired immunity. **Objective:** To investigate the immunological changes related to obesity and analyze the impact of moderate physical training on the immune system. **Methods:** Female Wistar rats were used that after the 21st post-natal care were divided into two groups according to the dietary regimen used: Control Group (CG) (n = 16) and obese group (OG) (n = 16). At 60 postnatal days, the groups were subdivided into sedentary (S) and trained (T), divided into four groups: Control-Sedentary (CS), Control-Trained (CT), Obese, Sedentary (OS) and Obese-Trained (OT). We evaluated weight, visceral fat, body mass index and white blood, followed by collection and analysis of cells from alveolar macrophages. **In vitro:** The culture of macrophages was evaluated phagocytosis rate, rate of adhesion, cell viability and production of nitric oxide. **Results:** At 105 days post-natal, observed an increase in body weight, BMI and visceral fat in OS. The naso-anal length did not differ between groups. In the blood, white series showed an increase in lymphocyte, neutrophil and basophil OT. Eosinophils did not differ between groups. In alveolar macrophages, the phagocytosis rate was higher for the trained animals [CT (p = 0.000) and T (p = 0.002)]. The production of nitric oxide stimulated with lipopolysaccharide increased in trained animals [CT (p = 0.014) and T (p = 0.000)]. The rate of adherence and cell viability did not differ between groups. **Conclusion:** The high fat diet was effective in increasing visceral fat, and reflected in the immune response. Physical training reverses the increased adiposity and protect the body against attacks promoted by obesity.

Keywords: fat diet; exercise; immunity; alveolar macrophages.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina

Figura 2 – Componente da dieta hiperlipídica/hipercalórica

Figura 3 – Fluxograma dos grupos experimentais submetidos à dieta e treinamento físico

Figura 4 – Procedimentos de traqueostomia (1), alíquotas de LBA (2), LBA coletado (3), LBA após centrifugação (4).

Figura 5 – Preparação do fungo para a taxa de fagocitose

Figura 6 – Placa de leitura e espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Pro; Biochron Ltda).

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - Construção de curva padrão para dosagem de óxido nítrico

TABELA 1- Composição da dieta padrão LABINA

TABELA 2 - Composição da dieta hiperlipídica/hipercalórica

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

CEEA: Comitê De Ética Em Experimentação Animal

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMSO: Dimetil Sulfóxido- solvente orgânico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EDTA: Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3%

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

HDL: lipoproteína de alta densidade

GL: Grupo Labina

GH: Grupo Hiperlipídico

GV: Gordura Visceral

IA: Índice de Adesividade

IMC: Índice de massa corporal

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

g/cm²: gramas por centímetro quadrado

LBA: Lavado bronco alveolar

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LIKA: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Lp: Leptina

LPS: Lipopolissacarídeos

LS: Labina Sedentário

LT: Labina Treinado

mL: mililitros

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl

nm: nanômetro

NaNO₂: Nitrato de Sódio

NK: células natural-Killers

NOS2: isoforma óxido nítrico macrofágica 2

ON: Óxido Nítrico

HS: Hiperlipídico Sedentário

HT: Hiperlipídico Treinado

PBS: Solução Tampão de Fosfato

POF: Pesquisa de Orçamento Familiar

RIE: Resposta Imune Específica

RINE: Resposta Imune Não-Específica

rpm: Rotações por Minuto

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*: meio de cultura celular

SF: Soro Fisiológico

SI: Sistema imune

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

TNF α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

WHO: *World Health Organization*

μ L: microlitros

μ M: micromols

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	16
1. INTRODUÇÃO	17
Obesidade	17
Treinamento Físico e Obesidade	18
Sistema Imune	20
Obesidade no Sistema Imune	22
Treinamento Físico no Sistema Imune	23
Obesidade e Treinamento Físico no Sistema Imune	25
1.1 Revisão Sistemática	27
Artigo – Submetido ao periódico: Revista Brasileira de Medicina do Esporte - ISSN (impresso): 1517-8692	27
1.2 HIPÓTESES	45
1.3 OBJETIVOS	45
1.3.1 Objetivo geral	45
1.3.2 Objetivos específicos	45
CAPÍTULO 2	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Animais	47
2.2 Manipulação Nutricional	47
2.3 Protocolo de Treinamento Físico Moderado	49
2.4. Delineamento Experimental	50
2.4.1 Avaliação do ganho ponderal	50
2.4.2 Avaliações Murinométricas	50
2.4.3 Análise das células sangue periférico	51
Amostras sanguíneas	51
Níveis de lactato	51
3. Análise Dos Parâmetros Imunológicos	51
3.1 Análise dos macrófagos do lavado bronco-alveolar (LBA)	52
3.1.1 Obtenção do LBA	52
3.2 Obtenção de células para cultura de macrófagos alveolares	52
3.3 Estudo da taxa de fagocitose	53
3.4 Taxa de fagocitose em macrófagos	53
3.5 Avaliação do índice de adesividade (IA)	54
3.6 Produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares	54
Construção da curva padrão	54
Processo de revelação da curva padrão e das amostras	55
3.7 Viabilidade Celular (<i>MTT TEST</i>)	56
3.8 Análise Estatística	56
CAPÍTULO 3	57
3. Referências Bibliográficas	58
	65
CAPÍTULO 4	70
4. Artigo 1 – A ser submetido ao periódico: Journal of Applied Physiology - ISSN (impresso): 0021-8987	71
CAPÍTULO 5	92
5. Considerações Finais	93
ANEXOS	

APRESENTAÇÃO

O desenho do estudo foi elaborado, inicialmente, através de levantamento bibliográfico que teve por finalidade buscar evidências que relacionassem exercício físico e obesidade a alterações no sistema imunológico. Tal levantamento culminou com a elaboração do primeiro artigo desta dissertação, no formato de revisão sistemática intitulada **Influência do treinamento físico nos parâmetros imunológicos em animais obesos: uma revisão sistemática** (CAPÍTULO 4). O artigo foi submetido ao periódico: Revista Brasileira de Medicina do Esporte - ISSN (impresso): 1517-8692.

Embasados nos achados desta revisão, realizamos um protocolo experimental objetivando analisar as possíveis repercussões do treinamento físico moderado sobre parâmetros murinométricos e imunológicos em ratas *Wistar* submetidas à dieta hiperlipídica pós-desmame.

Segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFPE, a dissertação apresentada deve ter a seguinte composição:

1. Capítulo – Introdução

- 1.1 Influência Do Treinamento Físico Nos Parâmetros Imunológicos Em Animais Obesos: Uma Revisão Sistemática.

- 1.2 Hipóteses

- 1.3 Objetivos

2. Capítulo – Material e Métodos

3. Capítulo – Referências Bibliográficas - referente ao capítulo 1 e 2

4. Capítulo – Resultados - sob a forma de um artigo.

- 4.1 4.2 Repercussões Do Treinamento Físico Moderado Na Resposta Imunológica de Macrófagos Alveolares *In Vitro* De Ratas Obesas

5. Capítulo – Considerações Finais

6. Limitações do Estudo

7. Anexos

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Obesidade

Considerada uma epidemia global, com cerca de 1,5 bilhões de adultos com excesso de peso, em que pelo menos 400 milhões são clinicamente obesos (WHO, 2005). A etiologia da obesidade é um processo multifatorial que envolve aspectos ambientais e genéticos (EGUCHI *et al.*, 2008), decorrente de mudanças dos hábitos de vida, tais como, alimentação inadequada e sedentarismo.

O acúmulo anormal ou excessivo de gordura acarreta prejuízos à saúde dos indivíduos (WHO, 2005). A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana e cerebrovascular, insuficiência cardíaca, apnéia do sono, esterilidade (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004). No sentido da desnutrição, diversas pesquisas foram realizadas sobre suas repercussões, tais como, metabólicas, imunes ou locomotoras (AMORIM, 2009; FERREIRA e SILVA, 2008; BARROS *et al.*, 2006). Atualmente, estudos buscam caracterizar a influência do sobrepeso/obesidade no sistema imune e metabólico (ZHOU *et al.*, 2011; NERY *et al.*, 2011; MELO, 2010; ZAMBON *et al.*, 2009; EGUCHI, 2008; GUERRA *et al.*, 2007).

O Brasil vive um período de transição nutricional. Observa-se declínio dos casos de desnutrição e aumento, em maior velocidade, da prevalência de sobrepeso e obesidade na população (IBGE, 2006; BATISTA-FILHO E RISSIN, 2003). Houve um crescente aumento na aquisição, pelos brasileiros, de alimentos ricos em açúcares, gorduras em geral e gorduras saturadas e redução no consumo de leguminosas e hortaliças (LEVY-COSTA *et al.*, 2005). Segundo a mais recente Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) realizada pelo IBGE (2010), o excesso de peso em homens e mulheres adultos saltou de 18,5% para 50,1% e de 28,7% para 48%, respectivamente.

Dados da POF indicam que obesidade aumenta em mais de quatro vezes para homens (de 2,8% para 12,4%) e em mais de duas vezes para

mulheres (de 8,0% para 16,9%), sendo as áreas urbanas mais atingidas (IBGE, 2010). Assim, segundo estes dados, nas últimas décadas, houve um crescimento considerável da obesidade no sexo feminino. Pesquisa com mulheres obesas brasileiras têm apontado a alta ingestão de lipídeos, muito freqüente nessa população (FRANCISCHI, PEREIRA & LANCHAJUNIOR, 2001), levando a um aumento na publicação de estudos relacionados à população feminina (CAMPBELL *et al.*, 2008; FRANCISCHI, PEREIRA & LANCHAJUNIOR, 2001; NIEMAN e PEDERSEN, 1999).

A obesidade pode ser induzida por alterações neuroendócrinas, genéticas ou dietéticas (DIEMEN, TRINDADE E TRINDADE, 2006). Para o estudo experimental do sobrepeso/obesidade, diferentes metodologias podem ser empregadas, sendo a indução pela dieta a mais utilizada (ZHOU *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2006; ESTADELLA *et al.*, 2004; GAÍVA *et al.*, 2001). De acordo com Gaíva *et al.*, (2001), a administração de dieta hiperlipídica/hipercalórica pode ser considerada um adequado modelo de indução de obesidade em ratos, por aumentar a quantidade de tecido adiposo. Estudo com animais submetidos a esta dieta relata aumento na adiposidade, intolerância à glicose, além de inflamação (SAMPEY *et al.*, 2011).

Diversas pesquisas demonstram estreita associação entre adiposidade abdominal e tolerância à glicose, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia (KRETSCHMER *et al.*, 2005; PEREIRA, FRANCISCHI & LANCHAJUNIOR, 2003). A distribuição da gordura corporal é relevante, especificamente a gordura visceral (GV). Assim, a quantificação da GV se torna importante para identificar indivíduos com maior risco para o desenvolvimento da síndrome metabólica (FILHO *et al.*, 2006). Segundo Nieman e Pedersen, (1999), o colesterol e a glicemia podem estar relacionados a prejuízos em vários aspectos do sistema imune.

Treinamento Físico e Obesidade

O exercício físico aumenta o gasto energético e reduz o risco de desenvolver obesidade e excesso de gordura corporal (GLEESON *et al.*, 2011;

GUERRA *et al.*, 2007; BERNARDES *et al.*, 2004). Logo, uma das maneiras de se prevenir ou até mesmo tratar a obesidade é através da prática de atividade física diária, a qual promove adaptações fisiológicas e funcionais no indivíduo. Em estudos epidemiológicos e de coorte foi encontrado uma associação entre obesidade e inatividade física (IBGE, 2006; LAKKA *et al.*, 2003). Atualmente, já se sabe que a relação entre inatividade e baixo gasto energético contribuem expressivamente para instalação de doenças crônico-degenerativas (WALSH *et al.*, 2011a).

São bem estabelecidos na literatura os benefícios da atividade física para a saúde, em estudos com humanos e animais (NERY *et al.*, 2011; BENER *et al.*, 2009; FEDIUC; CAMPBELL e RIDDELL, 2006; COSTA ROSA e VAISBERG, 2002). A longo prazo, atividade física regular pode proteger o organismo contra o desenvolvimento de doenças crônicas (WALSH *et al.*, 2011a). Entretanto, estas adaptações são dependentes da intensidade, duração e frequência da atividade (LEANDRO *et al.*, 2007).

Pesquisas realizadas em animais, mostram que o exercício físico induzido por corrida em cicloergômetro por 5 semanas, diminuiu o percentual de gordura na região epididimal (FEDIUC; CAMPBELL e RIDDELL; 2006). Da mesma forma, o treinamento físico com natação por 5 semanas, 5 dias/semana, diminuiu os tipos de colesterol maléfico, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e aumentou o benéfico, lipoproteína de alta densidade (HDL), diminuindo o risco de doenças coronarianas (GHAEMMAGHAMI *et al.*, 1986). O exercício físico aumenta a expressão de receptores para insulina no tecido adiposo e muscular (TJONNA *et al.*, 2008).

A atividade física diária é de suma importância para uma melhor qualidade de vida (COSTA ROSA, 2004). Muitos autores já evidenciaram os benefícios da atividade física diária, sejam eles metabólicos, respiratórios ou imunológicos (GUERRA *et al.*, 2007; LEANDRO *et al.*, 2002; NIEMAN *et al.*, 1995; HEATH *et al.*, 1991). Contudo, os mecanismos acerca dos benefícios do exercício não são compreendidos plenamente (WOODS, VIEIRA e KEYLOCK 2009).

Sistema Imune

O sistema imune (SI), responsável pela defesa do organismo, possui mecanismos de defesa divididos em dois ramos: sistema inato e adaptativo. O sistema inato é composto por pele, membranas mucosas, sistema complemento, enzimas e células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e células *natural killer*), responsável pela resposta imune não-específica (RINE) (ABBAS E LICHTMAN, 2007). O sistema imune adaptativo é composto por linfócitos T e B e por imunoglobulinas, e possui resposta imune específica (RIE) ao estímulo do antígeno apresentando memória. Vale salientar que elementos do sistema inato podem agir como efetores do sistema adaptativo (ABBAS E LICHTMAN, 2007; COSTA ROSA e VAISBERG, 2002).

A reação inflamatória é componente do mecanismo inato e essa resposta pode ocorrer em qualquer local do tecido exposto a um patógeno. Segundo Woods, Vieira e Keylock (2009) é considerada a primeira linha de defesa do organismo, retardando o estabelecimento de processo infeccioso. Nos tecidos, esses sinais são consequência de uma vasodilatação, do aumento da permeabilidade vascular e de um afluxo de células fagocitárias (DE CASTRO *et al.*, 1997).

O mecanismo de inflamação é desencadeado por liberação de citocinas, após o contato com o agente agressor (MARTON E KISS, 2000). Mediadores inflamatórios (histamina, leucotrienos) são liberados e contribuem para o recrutamento das células, sendo os neutrófilos os primeiros a atingir o local de infecção, os quais são sensíveis a agentes quimiotáticos liberados pelos mastócitos e basófilos (ABBAS E LICHTMAN, 2007). Na RINE estão presentes os macrófagos teciduais, células fagocíticas cuja função é reconhecer, ingerir e destruir os microrganismos e constituem a segunda maior população celular do sistema imune. A RIE é formada nos tecidos linfóides secundários, tais como, baço, timo, linfonodos e medula óssea. Esta ativação dos linfócitos pelo antígeno ocorre em diferentes compartimentos das células T e B (ABBAS E LICHTMAN, 2007).

Os macrófagos são mediadores da resposta imune inata, agem como primeira linha de defesa contra os microrganismos (WOODS, VIEIRA e

KEYLOCK, 2009) e pertencem ao sistema dos fagócitos mononucleares. Após o contato com o agente agressor, agem liberando citocinas que iniciam e amplificam o processo inflamatório (MÁRTON e KISS, 2000). A ativação dos macrófagos por endotoxinas induz a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, substâncias microbidas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos fagocitados (AMERSFOOT, BERKEL, KUIPER, 2003). Nesse processo, os macrófagos podem apresentar alterações, tais como: aumento de tamanho, de aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica (O'KEEFE *et al.*, 1997).

Outro elemento importante para a defesa do organismo é o óxido nítrico (ON), responsável pela defesa local dos pulmões (DELVES e ROITT, 2000). Evidências na literatura sobre o ON são datadas na década de 80 (BOGDAN, 2001). Segundo Flora Filho e Zilberstein, (2000), o ON tem ação na imunoregulação e se apresenta na inflamação e em mecanismos de autoimunidade. Assim, é definido como o produto de macrófagos ativados por citocinas e patógenos, derivado de uma reação enzimática (Figura 1). O ON participa da defesa do organismo, tendo ação microbicida e tumoricida *in vitro* (NATHAN, 1992).

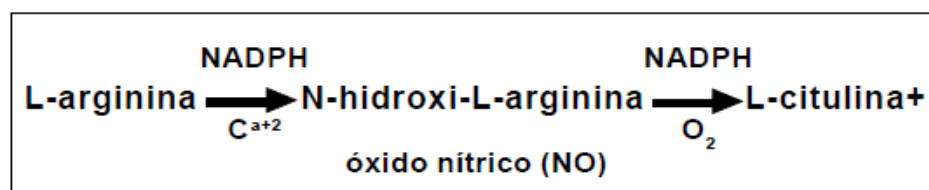


Figura 1 – Representação esquemática da síntese do óxido nítrico a partir da L-arginina. (Fonte: Flora Filho e Zilberstein, 2000).

No caso de doenças autoimunes e em situações de sobrecarga do organismo, o ON encontra-se em concentrações tóxicas para as células saudáveis (FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000). Uma das 3 isoformas da espécie reativa de nitrogênio que é controlada pelo sistema imune é a isoforma óxido nítrico macrofágica tipo 2 (NOS2) (BOGDAN, 2001). Estudos relacionando nutrição, exercício e produção de ON na imunidade são recentes na literatura (PORTO, 2011; DELMONDES, 2009), mas a análise da produção de ON já foi realizada em animais desnutridos sedentários (FERREIRA e SILVA, 2008) e

submetidos ao exercício físico de natação (DELMONDES, 2009). Porém, existem lacunas sobre a repercussão da produção de ON em animais submetidos à dieta hiperlipídica, logo, é importante estudos acerca deste tema.

Obesidade no Sistema Imune

A defesa do organismo está diretamente relacionada à condição nutricional do indivíduo. Quando há um desequilíbrio entre o gasto e o consumo energético, os processos imunológicos estarão afetados (MARTÍ, MARCOS e MARTÍNEZ, 2001). A obesidade acarreta alterações sobre a imunidade celular, especialmente no recrutamento de leucócitos e subpopulações linfocitárias e na proliferação de linfócitos em resposta a mitógenos como também na imunidade humoral, sobretudo a secreção de anticorpos (MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003). Indivíduos obesos são susceptíveis a infecções e doenças auto-imunes, e são incapazes de combatê-las de forma eficaz, o que atesta um elo entre o tecido adiposo e as células imunes (MARTÍ, MARCOS e MARTÍNEZ, 2001).

Evidências na literatura sugerem ser a obesidade uma doença crônica inflamatória (CESCHI *et al.*, 2007) e um motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes (ALVES, 2006). A obesidade promove produção anormal de citocinas inflamatórias, que têm efeito local e sistêmico (CESCHI *et al.*, 2007), além de provocar maior susceptibilidade a alguns tipos de câncer, bacteremia e maior tempo de cicatrização após uma cirurgia (LAMAS, MARTÍ e MARTÍNEZ, 2002). Dados clínicos e epidemiológicos indicam que pacientes obesos possuem elevada incidência e gravidade de infecções quando comparados com pessoas magras (CESCHI *et al.*, 2007; FALAGAS e KOMPOTI, 2006).

Em modelos animais, manipulação com dieta rica em gordura acarretou prejuízos à função imune (MELO, 2010). Smith *et al.* (2007) mostraram que, em camundongos cuja dieta induziu obesidade, houve maior mortalidade quando esses foram infectados pelo vírus *Influenza* em relação aos normonutridos, devido à menor expressão de citocinas antivirais e redução da citotoxicidade das células natural-Killers (NK). Em ratos também foram observados linfopenia e

menor resposta mitógena dos esplenócitos (LAMAS; MARTÍ; MARTÍNEZ, 2002). Em humanos, estudo com mulheres obesas verificou que não houve alteração da função imunológica entre grupos obesos ou não (NIEMAN, 1996). Entretanto, aumento da gordura corporal promoveu uma maior contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes (NIEMAN e PEDERSEN, 1999), indicando maior produção destes componentes decorrente da obesidade.

Deste modo, fatores metabólicos, nutricionais e endócrinos estariam envolvidos na resposta imune (MOULIN *et al.*, 2009; SAMARTÍN & CHANDRA, 2001). A inflamação crônica pode acarretar maior produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas que induzem alterações e danos ao DNA, o que contribui para o desenvolvimento de câncer (CESCHI *et al.*, 2007). Atualmente sabe-se que além de papel no armazenamento de reservas energéticas, o tecido adiposo tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir diversos hormônios e moléculas de sinalização denominadas adipocinas. Uma dessas moléculas é a leptina (Lp) (AHIMA e FLIER, 2000), secretadas pelos adipócitos, e ativadas na regulação da função imunológica. Portanto, o tecido adiposo promove diferentes funções no organismo, seja imunológica, metabólica ou endócrina.

Treinamento Físico no Sistema Imune

Além da obesidade, outros fatores parecem influenciar diretamente na atuação dos componentes do SI. Dentre estes se destaca o papel do exercício físico, que promove modificações no SI (LEANDRO *et al.*, 2002; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). As alterações transitórias causadas por uma súbita carga de exercício físico fazem parte do conjunto de respostas orgânicas agudas (ALI, ULLAH, JAN, 2003). Embora o significado clínico dessas mudanças ainda não esteja totalmente estabelecido, constata-se que alguns parâmetros imunes são afetados (NIELSEN, 2003).

Dessa forma, o exercício físico, a depender de sua magnitude, parece alterar a resposta imunológica e se esta atuação é benéfica ou deletéria, dependerá da intensidade, da frequência e da duração do esforço (LEANDRO,

et al., 2007). Benefícios à saúde são relacionados ao treinamento físico de intensidade moderada (NIEMAN, 2000) e melhoria de muitas funções imunes, parecendo prevenir ou retardar a progressão de alguns tumores (ALMEIDA *et al.*, 2009; BACURAU *et al.*, 2000). Há também relatos de uma baixa incidência de infecções do trato respiratório superior em indivíduos que se exercitavam regularmente (NIEMAN *et al.*, 1995; HEATH *et al.*, 1991). Assim, o treinamento físico de intensidade moderada parece promover adaptações fisiológicas e imunológicas que repercutem de forma positiva no organismo (ALMEIDA *et al.*, 2009; LEANDRO *et al.*, 2002; NIEMAN, 2000; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Encontra-se na literatura diversos trabalhos relacionando os efeitos do exercício físico com as funções do sistema imunológico (MURPHY *et al.*, 2011; NAVARRO *et al.*, 2010; BACURAU, 2000; NIEMAN *et al.*, 1995; HEATH *et al.*, 1991). Estudos mostram que em animais submetidos ao treinamento físico de natação (6 semanas, 5 dias/semana) houve aumento na taxa de fagocitose de macrófagos alveolares (DELMONDES, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2004), e peritoneais (FERREIRA *et al.*, 2010; NAVARRO *et al.*, 2010; DOS SANTOS, MELLO e COSTA ROSA, 2009). No estudo de Murphy *et al.* (2011), também se observou regressão do desenvolvimento de tumor em camundongos fêmeas submetidas ao exercício de esteira (20 semanas, 6 dias/semana), o que confere ao exercício aeróbio um efeito natural antiinflamatório (DAS, 2006).

Em humanos, o exercício moderado aumentou a resistência a infecções respiratórias do trato superior em mulheres submetidas à caminhada (Nieman *et al.*, 1995). Atletas possuem menores níveis de citocina em relação a não-atletas, quando expostos a exercício extenuante (GOKHALE *et al.*, 2007). Em corredores treinados, nenhuma alteração foi verificada na contagem diferencial de leucócitos do sangue (BAUM, LIESEN e ENNEPER, 1994). Aumento na contagem total e diferencial de leucócitos no sangue em diferentes tipos de exercício (BRENNER *et al.*, 2003). Em indivíduos obesos, também foram relacionados elevados níveis de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos (NIEMAN, 1996).

De forma geral, o exercício físico regular é associado com adaptações fisiológicas, hormonais e imunorreguladoras (KIM *et al.*, 2003; BRENNER *et al.*,

2003). Modula a redistribuição sistêmica das células imunes em diferentes tecidos: pulmão, músculo esquelético e baço (ADAMS, 2011). Estas alterações transitórias podem ser reflexos de uma automodulação das células imunes em prol da homeostase (LEANDRO *et al.*, 2002). Sendo assim, percebe-se que as adaptações fisiológicas e imunológicas repercutem de forma benéfica para o organismo com o treino moderado (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; LEANDRO *et al.*, 2007).

Obesidade e Treinamento Físico no Sistema Imune

De acordo com o exposto anteriormente, a principal função do SI é proteger o organismo contra doenças infecciosas (GLEESON, 2006), e pode ser influenciada tanto pela obesidade quanto pelo exercício físico. Disfunções do sistema imunológico podem ser decorrentes de alterações metabólicas, como também do estresse oxidativo decorrente de treinamentos físicos extenuantes (ANGELI *et al.*, 2004). Estas alterações vêm sendo relacionadas ao aumento da taxa de infecções (KHAN *et al.*, 1999; HEATH *et al.*, 1991).

Diferentes pesquisas em animais têm-se voltado para a resposta do sistema imunológico a diferentes agentes indutores de estresse, como, por exemplo, a nutrição e o exercício físico (ZHOU *et al.*, 2011; MELO, 2010; DELMONDES, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Segundo Kretschmer *et al.*, (2005) há íntima associação entre adiposidade abdominal e hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, os quais podem estar relacionados a prejuízos em vários aspectos da imunidade (MORIGUCHI *et al.*, 1998; NIEMAN e PEDERSEN, 1999). Um exemplo é a expressão dos linfócitos T (Helper CD4+), reguladores da resposta imune decorrente da produção de citocinas que ativam os macrófagos (MOULIN *et al.*, 2009).

Contudo, o exercício físico é também outro fator de estresse que afeta a imunidade, dependente da duração, frequência e intensidade do esforço (BALTOPOULOS, 2009; LEANDRO *et al.*, 2007; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Os mecanismos associados a alterações imunológicas são multifatoriais e se correlacionam com diversos sistemas, endócrino ou nervoso

(PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Sugere-se uma inter-relação entre o SI e estes acima citados. Inicialmente, ocorre uma ativação do sistema nervoso simpático, que promove aumento na concentração de catecolaminas na circulação e ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, induzindo aumento na concentração de glicocorticóides (BACURAU, 2000; WOODS, 1999).

As células do SI possuem receptores para estes hormônios (GARCIA, 2003). Especialmente os macrófagos são sensíveis aos efeitos do estresse via receptores para glucocorticóides (WOODS, 1999). Além de secretarem citocinas que irão agir em órgãos neuroendócrinos (COSTA ROSA, 2004). O estudo da imunidade em modelos animais tem grande importância ao verificar as repercussões entre a nutrição e o exercício físico (ZHOU *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2010; YAMASHITA *et al.*, 2010; DELMONDES, 2009; NIEMAN e PEDERSEN 1999). A relação obesidade, exercício físico e SI ainda são escassas na literatura (PORTO, 2011; TEIXEIRA DE LEMOS *et al.*, 2009; MORIGUCHI *et al.*, 1998; NIEMAN, 1996).

Assim, são necessárias mais evidências acerca das alterações decorrentes da obesidade nos parâmetros imunológicos e quanto o treinamento físico é capaz de repercutir sobre este sistema. Com isso, alguns aspectos podem ser esclarecidos e contribuir ainda mais numa perspectiva diferenciada para a promoção de saúde e qualidade de vida em obesos.

1.1 Revisão Sistemática

Artigo – Submetido ao periódico: Revista Brasileira de Medicina do Esporte
- ISSN (impresso): 1517-8692

INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM ANIMAIS OBESOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.

INFLUENCE OF PHYSICAL TRAINING ON IMMUNE PARAMETERS IN OBESE ANIMALS: A SYSTEMATIC REVIEW

Patrícia Clara Pereira dos Santos¹, Maria do Amparo Andrade², Maria Patrícia Pereira Melo³, Célia Maria Machado Barbosa de Castro⁴

¹ Mestrado em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE;

² Docente do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco e Doutora em Enfermidades Tropicais - Universidade de Salamanca –Espanha;

³ Mestrado em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE;

⁴ Docente do Departamento de Nutrição e Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE e Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará - UFCE, CE.

Correspondência: Patrícia Clara Pereira dos Santos. Universidade Federal de Pernambuco. Boa Vista – Recife – PE - Brasil – CEP: 50050-200. Telefone: (81) - 21268000 - e-mail: patriciaacps@yahoo.com.br.

RESUMO

Introdução: É bem estabelecido na literatura que há alterações imunológicas decorrentes do treinamento físico, contudo, a associação do fator obesidade, que é um estado crônico de inflamação, ainda não é bem estabelecida. **Objetivo:** analisar através de uma revisão sistemática as evidências científicas disponíveis sobre a ação do treinamento físico sobre os componentes da função imune em animais obesos. **Materiais e método:** Foram selecionados estudos experimentais com ratos, indexados nas bases de dados PUBMED, SCIENCE DIRECT, LILACS e SCIELO, utilizando os seguintes descritores MeSH/DECS: “animais”, “obesidade”, sistema imune” e “treinamento físico/ exercício/ exercício físico” bem como seus equivalentes em inglês, utilizando os operadores booleanos OR e AND. **Resultados:** Quatro estudos de baixa qualidade metodológica envolvendo ratos sob treino aeróbio foram incluídos. Nenhum dos trabalhos apresentou uniformidade quanto aos parâmetros imunes analisados e protocolos de exercício. Foi observada diferença significativa em marcadores inflamatórios em animais submetidos ao treino, em três estudos, com interleucinas 6 e 10 e o fator de necrose tumoral alfa. Contudo, os tecidos alvo foram distintos. **Conclusão:** Devido a baixa qualidade metodológica dos estudos selecionados e a existência de protocolos de treino e parâmetros imunes distintos, temos insuficiente evidência para afirmar qual parâmetro imunológico é mais influenciado pelo exercício em animais obesos.

Descritores: animais; obesidade; exercício; sistema imune

ABSTRACT

Introduction: It is well established in the literature the immunological changes resulting from physical training, however, the association of obesity factor, which is a state of chronic inflammation, is not well established. **Objective:** To analyze through a systematic review of the available scientific evidence on the effect of physical training on the components of immune function in obese animals. **Materials and method:** We selected experimental studies with rats, indexed in PUBMED, SCIENCE DIRECT, LILACS and SciELO, using the following MeSH descriptors / DECS: "animals", "obesity" immune system "and" physical training / exercise / physical exercise "as well as their english equivalents, using the boolean operators AND and OR. Results: Four studies of low methodological quality involving rats under aerobic training were included. None of the studies showed uniformity in the immune parameters analyzed and exercise protocols. Significant difference in inflammatory markers in animals subjected to training in three studies with interleukins 6, 10 and tumor necrosis factor alpha. However, the target tissues are different. **Conclusion:** Due to the low methodological quality of selected studies and the existence of training protocols and different immune parameters, we have insufficient evidence to say which immunological parameter is more influenced by exercise in obese animals.

Descriptors: animals, obesity, exercise, immune system

INTRODUÇÃO

A etiologia da obesidade é um processo multifatorial que envolve aspectos ambientais e genéticos que acarreta prejuízos à saúde ^(1,2,3). Evidências na literatura sugerem ser a obesidade uma doença crônica inflamatória ^(4,5), e tornar-se um motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes. Indivíduos obesos são susceptíveis a infecções e doenças auto-imunes, e são incapazes de combatê-las de forma eficaz. O que denota um elo entre o tecido adiposo e as células imunes ⁽⁶⁾. Em animais a obesidade pode ser induzida por alterações neuroendócrinas, genéticas ou dietéticas ⁽³⁾.

Diversas pesquisas demonstram estreita associação entre adiposidade abdominal e tolerância à glicose, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia ^(2,7,8). Segundo estudo de Nieman *et al.*, (1999) ⁽⁹⁾, o colesterol e a glicemia podem estar relacionados a prejuízos em vários aspectos do sistema imune. Fatores metabólicos, nutricionais e endócrinos estariam envolvidos na resposta imune ⁽¹⁰⁻¹²⁾. A inflamação a longo prazo pode acarretar numa maior produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas que induzem a alterações e danos ao DNA, o que contribui para o desenvolvimento de câncer ⁽⁴⁾.

Uma das maneiras de se prevenir ou até mesmo tratar a obesidade é através da prática de atividade física diária que promove adaptações fisiológicas e funcionais no indivíduo. Estas adaptações estão na dependência da intensidade, duração e frequência da atividade ⁽¹²⁾. Evidências dos benefícios da atividade física para a saúde podem ser observadas em estudos com humanos e animais ^(2,7,13,14). Exercício físico regular é associado com adaptações fisiológicas, hormonais e imunorreguladoras ^(12,15,16). O exercício modula a redistribuição sistêmica das células imunes em diferentes tecidos: pulmão, músculo esquelético e baço ⁽¹⁷⁾. De acordo com Leandro, (2002) ⁽¹⁸⁾, estas alterações transitórias podem ser reflexos de uma automodulação das células imunes em prol da homeostase.

Particularmente o treinamento físico de intensidade moderada está associado a benefícios para a saúde ⁽¹⁹⁾ e melhoria de muitas funções imunes, parecendo retardar ou prevenir a incidência e a progressão de alguns tumores ^(20,21). Assim, este tipo de treinamento físico de intensidade moderada parece promover adaptações fisiológicas e imunológicas que repercutem de forma positiva no organismo ^(12,19-24).

Os estudos relacionando obesidade, treinamento físico e sistema imune são considerados de extrema relevância, levando em consideração a ocorrência da obesidade na atualidade e a escassez de evidências. Não há revisões sistemáticas acerca da influência do treinamento físico sobre os mecanismos associados à obesidade em animais. Diante do exposto, o objetivo foi analisar sob forma de uma revisão sistemática, a influência do treinamento físico aeróbio na resposta imunológica em animais obesos.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi baseada em estudos experimentais, sem restrição lingüística ou de período, nas bases de dados indexadas no PubMed/MEDLINE, Science Direct, LILACS e SciELO. As palavras-chaves utilizadas, de acordo com a descrição dos termos de MeSH e DeCS, foram: “animais”, “obesidade”, “sistema imune” e “treinamento físico/exercício/exercício físico” bem como seus equivalentes em inglês. As combinações entre estas palavras foram realizadas em cada base de dados supracitadas

utilizando os operadores booleanos OR e AND. Essa pesquisa foi realizada no período de outubro-2010/janeiro de 2011.

Como critérios de inclusão, foram selecionados os estudos do tipo experimental, limitado a ratos, submetidos a qualquer tipo de atividade ou treinamento físico e indução de obesidade, seja ela genética, neuroendócrina ou dietética. Foram excluídos estudos em que outros animais (coelhos, eqüinos e porcos) fossem utilizados e onde os animais fossem submetidos à intervenção hormonal, cirúrgica ou farmacológica antes ou após o exercício. Os estudos foram primeiramente selecionados conforme os critérios de elegibilidade acima destacados e aqueles que geraram dúvidas foram retidos para posterior análise. Todos os estudos foram avaliados por dois revisores independentes e as divergências foram discutidas com um terceiro avaliador.

Quanto à qualidade metodológica (Tabela 1), os artigos foram avaliados através de componentes individuais. Os principais componentes analisados foram randomização, cegamento dos resultados e análise estatística, sendo considerados os seguintes critérios: “adequado”, “inadequado”, “não relatado” e “relatado”. Não foi possível a realização de uma meta-análise devido à heterogeneidade dos estudos incluídos.

RESULTADOS

De 200 artigos inicialmente encontrados na busca através das bases de dados pesquisadas, 190 foram excluídos com base no título e 10 foram analisados de maneira mais criteriosa (Figura 1). Desses, 06 foram excluídos, e 4 artigos foram incluídos (Moruguchi *et al.*, 1998; Teixeira de Lemos *et al.*, 2009; Martin-Cordero *et al.*, 2009 e Yamashita *et al.*, 2010)⁽²⁵⁻²⁸⁾, informações e dados principais referentes às características destes estudos encontram-se na Tabela 2.

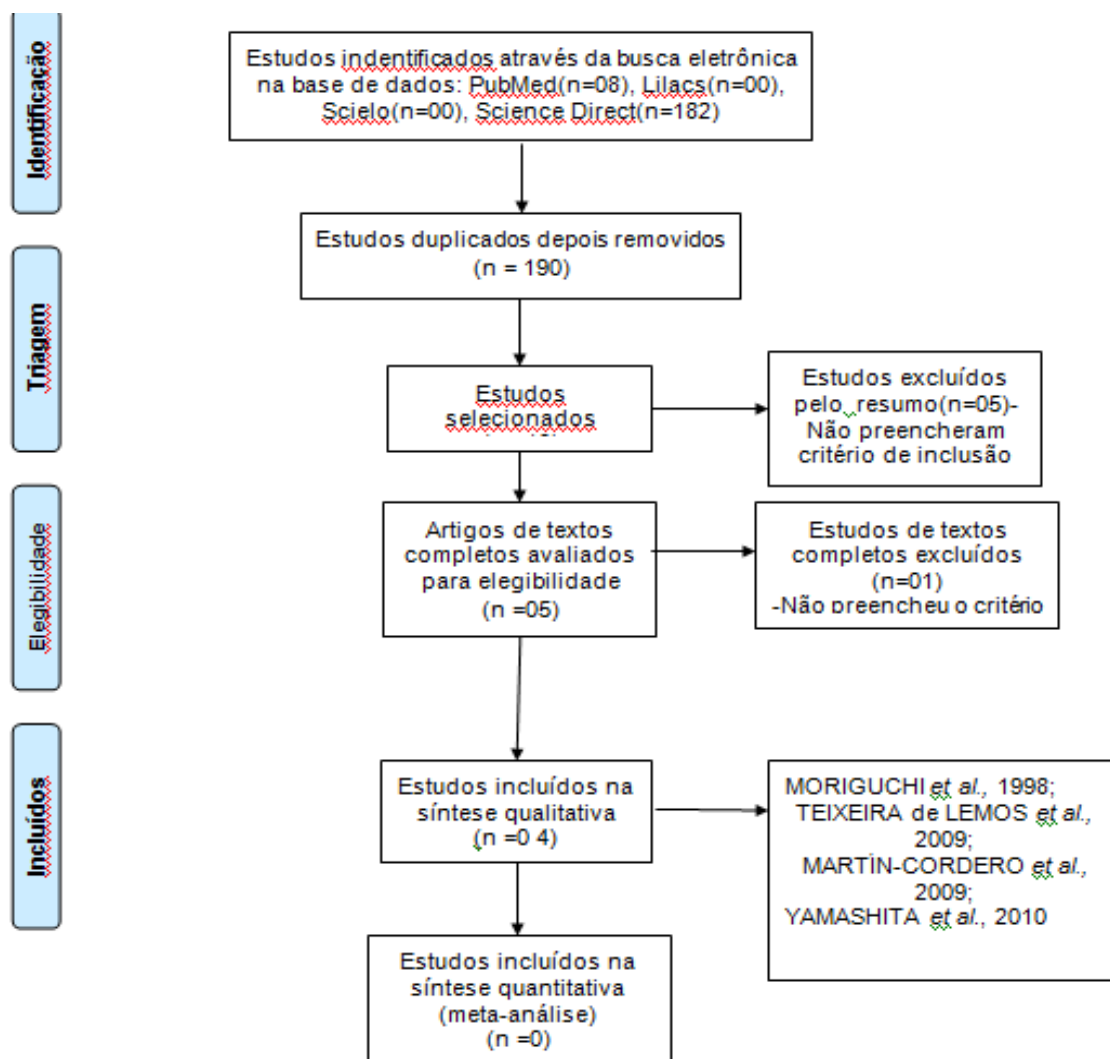


FIGURA 1 – Organograma de busca e seleção dos estudos para a revisão sistemática de acordo com *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) ⁽²⁹⁾.

Os resultados desta pesquisa indicam pouca evidência nas pesquisas sobre o sistema imunológico e o exercício em obesos. Além disto, são estudos recentes, sendo o mais antigo publicado sobre esse tema da década de 90 (Moriguchi *et al.*, 1998)⁽²⁵⁾. Em relação à qualidade metodológica, apenas dois estudos (Yamashita *et al.*, 2010 e Teixeira de Lemos *et al.*, 2009)^(26,28) relataram randomização, contudo, o método não foi exatamente descrito. Nenhum dos artigos incluídos relatou cegamento na análise dos resultados e todos realizaram análise estatística adequada ⁽²⁵⁻²⁸⁾ (Tabela 1).

Quanto à obesidade, três estudos^(25,26,27) incluíram animais geneticamente modificados, denominados ratos Zucker, enquanto que apenas um estudo o de Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾ incluiu ratos Wistar por indução dietética. Todos os estudos investigados avaliaram os animais através do treinamento físico. Quanto à modalidade, a esteira foi utilizada em três artigos^(25,27,28) e a natação (Teixeira de Lemos *et al.*, 2009)⁽²⁶⁾ (Tabela 2).

Os estudos avaliaram o treinamento físico isoladamente (Moriguchi *et al.* 1998 e Teixeira de Lemos *et al.*, 2009)^(25,26,), combinado com dieta de restrição de energia, Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾ ou concomitante ao exercício agudo, Martin-Cordero *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾. Embora em todos os estudos, utilizassem o treinamento físico, não houve homogeneidade quanto à duração, intensidade e frequência do exercício, tanto pelo período quanto pela forma de adaptação (Tabela 2).

Os autores não foram unânimes em relação aos parâmetros imunes avaliados, nem aos tecidos investigados (Tabela 2). Apenas 2 estudos^(26,28) contemplaram as interleucinas 6 e 10 (IL- 6 e IL-10) e o fator de necrose tumoral α (TNF α) em seus trabalhos, contudo, os tecidos alvo foram distintos, sangue e tecido branco adiposo respectivamente. Estudo de Moriguchi *et al.*, (1998)⁽²⁵⁾ abordou as células natural killer (NK) e linfócitos do baço, e Martin-Cordero *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾, interleucina 1 (IL- 1) e interferon gama (IFN γ) de macrófagos peritoneais.

Quanto ao delineamento experimental dos estudos investigados, adaptamos nas diretrizes de padrão-ouro em análises experimentais de Hooijmans *et al.*, (2010)⁽³⁰⁾ (Tabela 3). Todos os estudos utilizaram ambiente com adequado manejo laboratorial, controle de luz, nutrição/água *ad libitum* nos animais. Apenas Martin-Cordero *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾ não relatou controle de temperatura e umidade no ambiente laboratorial. O mesmo foi observado quanto à umidade no trabalho de Moriguchi *et al.*, (1998)⁽²⁵⁾ (Tabela 3).

Com relação aos resultados, os achados foram similares entre 2 artigos^(26,28) houve uma redução significativa na concentração de IL- 6 ($p < 0,001$) e TNF α ($p < 0,05$). Achado semelhante na redução da atividade das células NK do baço ($p < 0,05$) no trabalho de Moriguchi *et al.*, (1998)⁽²⁵⁾. Entretanto

nenhuma modificação foi verificada na concentração de IL- 1 e IFN γ em animais exercitados no estudo de Martin-Cordero et al., (2009)⁽²⁷⁾, apenas quando submetidos ao exercício agudo somente com a IL-1 β ($p < 0,01$) ou estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) obtiveram aumento na produção das citocinas, porém não significativa (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Os resultados desta revisão sistemática tiveram por objetivo avaliar a influência do treinamento físico aeróbio sobre o sistema imune de animais obesos. Estes achados demonstram que houve redução nos componentes pró-inflamatórios destes animais, e que o exercício promoveu repercussão no sistema imunológico, apesar da heterogeneidade entre os estudos (Tabela 4). Uma vez que não foi possível verificar qual tipo de treinamento foi o mais efetivo sobre a imunidade.

Quanto a da seleção aleatória dos animais, apenas 2 artigos^(26,28), realizaram a randomização, entretanto, sem descrever detalhes do processo de seleção. Sabe-se da importância deste meio em um estudo experimental, tendo como objetivo reduzir o viés de seleção. Dessa forma, evitaria uma interferência direta da genética numa ninhada no resultado, podendo alcançar um valor superestimado ou subestimado. Nenhum dos artigos foi relatado, avaliação cega dos dados, o que ajudaria a controlar o viés de mensuração, porém, devido à característica de intervenção dos estudos incluídos não foi possível esta prática, análise estatística foi adequada para os 4 artigos^(25,26,27,28) investigados (Tabela 1).

As evidências científicas disponíveis se mostraram divergentes quanto à linhagem dos animais escolhidos. Cerca de 3 trabalhos^(25,26,27) utilizaram ratos da linhagem Zucker, uma mutação autossômica recessiva no cromossomo 5 (Leprfa), gene receptor da leptina, com fêmeas (Moriguchi *et al.*, 1998)⁽²⁵⁾ e machos (Teixeira de Lemos *et al.*, 2009 e Martin-Cordero *et al.*, 2009)^(26,27). Apenas um contemplou a linhagem Wistar, Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾, induzindo obesidade por meio dietético (Tabela 2). Todavia, não se tem definido na literatura qual seria a linhagem de animal mais adequada para o estudo dos efeitos do treinamento físico sobre os parâmetros imunológicos.

Havendo, portanto, uma necessidade de uma metodologia mais rigorosa para esta definição.

Controvérsias acerca de três trabalhos^(25,26,27) sobre a linhagem dos animais. Segundo Moriguchi *et al.*, (1998)⁽²⁵⁾, a linhagem Zucker seria o modelo adequado para investigar os efeitos da obesidade sobre o sistema imunológico, já que possuem aumento no peso corpóreo e hiperlipidemia, mas concentrações de glicose no plasma normais, o que demonstraria que os animais não possuíam síndrome metabólica e eram normais. Entretanto, Teixeira de Lemos *et al.*, 2009 e Martin-Cordero *et al.*, 2009^(26,27) relataram que a linhagem Zucker possui características metabólicas em comum com os humanos: obesidade associada a diabetes tipo II, tais como resistência à insulina, hiperlipemia, hipercolesterolemia e hiperinsulinemia, um indicativo da síndrome metabólica (SM).

No que se refere aos parâmetros de frequência, duração e intensidade do treinamento físico dos modelos experimentais, os estudos incluídos nesta revisão não relataram uniformidade entre os protocolos de treino físico aeróbio seja intensidade e duração (Tabela 2). Quanto à frequência, três trabalhos^(25,27,28) realizaram 5 dias/semana o treinamento e a modalidade, foi a mesma, esteira. Entretanto, protocolo distinto foi realizado em outro trabalho⁽²⁶⁾, 3 dias/semana e a natação foi aplicada. O que denota a heterogeneidade entre os estudos e interfere na sua reprodutibilidade, já que nenhum protocolo validado da literatura foi utilizado. Apenas um estudo, o mais recente de Yamashita *et al.* (2010)⁽²⁸⁾, mensurou o consumo de oxigênio (55% $VO_{2máx}$) para a intensidade, validando seu protocolo como treinamento moderado.

Em relação ao tecido alvo estudado, diferentes regiões do organismo: baço, sangue, peritônio e tecido branco adiposo foram investigados^(25,26,27,28), logo, diferentes técnicas para extração dos dados foram aplicadas. Entretanto, alguns autores^(25,27) preconizam a aquisição dos linfócitos e macrófagos, ou citocinas plasmáticas⁽²⁶⁾, enquanto que Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾, priorizou os adipócitos (Tabela 2). Vale ressaltar que há uma modulação na distribuição sistêmica das células imunes decorrente do exercício em diversos tipos de tecidos⁽¹⁷⁾.

Os achados acerca da influência do exercício foram heterogêneos entre os estudos. Treinamento isolado em esteira promoveu redução na atividade das células NK e da resposta mitógena dos esplenócitos⁽²⁵⁾. Este mesmo autor observou aumento na expressão do transportador de glicose (GLUT-1), que dispõe energia aos linfócitos. Já na modalidade de natação, houve uma diminuição significativa nas citocinas do sangue, IL-6 e TNF α por Teixeira de Lemos *et al.*, (2009)⁽²⁶⁾, o que denota melhoria dos mecanismos antiinflamatórios decorrentes do exercício (Tabela 4).

Com o mesmo modelo animal dos estudos supracitados^(25,26), Martin-Cordero *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾ utilizou o treino moderado associado ao agudo, porém não houve alterações significativas no número de macrófagos peritoneais e concentração de IL-1 e TNF α , somente quando estimulados por LPS, e no exercício agudo, apenas um aumento no IL-1 nos ratos obesos. Contudo, apenas Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾, utilizou ratos Wistar em seu trabalho, mas os achados foram similares aos de Teixeira de Lemos *et al.*, (2009)⁽²⁶⁾, redução significativa nos níveis de IL-6 e TNF α , só que no tecido adiposo branco (Tabela 4).

Houve consenso entre três estudos^(26,27,28) quanto ao exercício ser uma ferramenta válida como mecanismo antiinflamatório. O treinamento físico crônico pode melhorar a resposta imune mediada em animais com diabetes tipo 2, impedindo o desenvolvimento de inflamação crônica⁽²⁶⁾. Entretanto, artigo de Martin-Cordero, *et al.*, (2009)⁽²⁷⁾ observou a importância de intensidade e duração apropriada do exercício como uma ferramenta antiinflamatória. Estudo de Moriguchi *et al.*, (1998)⁽²⁵⁾, apenas relatou a melhora no transporte de glicose dos linfócitos, e Yamashita *et al.*, (2010)⁽²⁸⁾ não denotou incremento no mecanismo antiinflamatório associado à restrição de energia nos animais (Tabela 4).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatamos na presente revisão sistemática que não há um consenso na literatura em relação ao método de treinamento físico ideal para restaurar os parâmetros imunológicos destes animais obesos, o que dificulta um resultado homogêneo deste tipo de intervenção. Mas, de forma geral, a aplicação do treinamento físico aeróbio mostrou-se benéfica na resposta antiinflamatória do organismo no animal. Protocolos de treino diferentes podem alterar a resposta imune. Não há evidência suficiente para dar suporte e relatar quais parâmetros imunes são os mais susceptíveis a tais alterações, devido A heterogeneidade e baixa qualidade metodológica destes estudos. Dessa forma, sugere-se a realização de mais evidências acerca deste tema.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? Geneva. Introduction, *Standing Committee on Nutrition* 29: 3-4, 2005.
2. EGUCHI R., CHEIK N.C., OYAMA L.M., do NASCIMENTO C.M.O., MELLO M.T. de.,TUFIK S., DAMASO A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14 (3): 182-7, 2008.
3. DIEMEN V. V.; TRINDADE E. M.; TRINDADE M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21:425-29, 2006.
4. CESCHI M, GUTZWILLER F, MOCH H, EICHHOLZER M, PROBST-HENSCH NM. Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Swiss Medicine Wkly*, 137(3-4):50-6, 2007.
5. ALVES MNR. Os efeitos da obesidade na resposta imune. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 21(4): 316-19, 2006.

6. MARTÍ A, MARCOS A, MARTINEZ JA. Obesity and immune function relationships. *Obesity Reviews*, 2: 131-40, 2001.
7. KRETSCHMER BD, SCHELLING P, BEIER N, LIEBSCHER C, TREUTEL S, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences*, 76: 1553–73, 2005.
8. PEREIRA LO, FRANCISCHI RP, LANCH A Jr AH. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, 47: 111-127, 2003.
9. NIEMAN DC, PEDERSEN BK. Exercise and Immune Function: Recent Development. *Sports Medicine*, 27(2): 73-80, 1999.
10. MOULIN CM, MARGUTI I, PERON JPS, RIZZO LV, HALPERN A. Impact of adiposity on immunological parameters. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*, 53 (2): 2009.
11. SAMARTÍN, S, CHANDRA, RK. Obesity, overnutrition and the immune system. *Nutrition Research*, 21;243-62, 2001.
12. LEANDRO CG, LEVADA AC, HIRABARA SM, et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 21 (3): 751-6, 2007.
13. FEDIUC S, CAMPBELL JE, RIDDELL MC. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of Applied Physiology*, 100: 1867-75, 2006.
14. BENER A, ZIRIE M, MUSALLAM M, KHADER YS, AL-HAMQA AO. Prevalence of Metabolic Syndrome According to Adult Treatment Panel III

- and International Diabetes Federation Criteria: A Population-Based Study. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2009.
15. KIM H., SHIN MS, KIM SS, LIM BV, KIM HB, *et al.* Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague- Dawley rats. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 43:99-104, 2003.
 16. BRENNER I, SHEK PN, ZAMECNIK J, SHEPHARD RJ. Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 10: 130-143, 1998.
 17. ADAMS GR, ZALDIVAR FP, NANCE DM, KODESH E, RADOM-AIZIK S, COOPER DM. Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity* 25:658-666, 2011.
 18. LEANDRO CG, NASCIMENTO E, MANHÃES-DE-CASTRO R, DUARTE JÁ, DE CASTRO CMMB. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2(5):80-90, 2002.
 19. NIEMAN, D.C. Is infection risk linked to exercise workload? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32:406-411, 2000.
 20. MURPHY EA, DAVIS JM, BARRILLEAUX TL, MCCLELLAN JL, STEINER JL, *et al.* Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine*, 55; 274-279, 2011.
 21. ALMEIDA PWM, GOMES-FILHO A, FERREIRA AJ, RODRIGUES CEM, DIAS-PEIXOTO MF, *et al.* Swim training suppresses tumor growth in mice. *Journal of Applied Physiology*, 107: 261–265, 2009.

22. NAVARRO F, BACURAU AVN, ALMEIDA SS, BARROS CC, MORAES MR, et al. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochemistry And Function*, 28: 266–273, 2010.
23. BACURAU RF, BELMONTE MA, SEELAENDER MC, COSTA RLF. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochemistry And Function*, 8: 249-58, 2000.
24. PEDERSEN KB E HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiology Reviews*, 80(3): 1055-1081, 2000.
25. MORIGUCHI S, KATO M, SAKAI K, YAMAMOTO S, SHIMIZU E. Exercise training restores decreased cellular immune functions in obese Zucker rats. *Journal of Applied Physiology*. 84(1):311-7.1998.
26. TEIXEIRA DE LEMOS E.; REIS F.; BAPTISTA S.; PINTO R.; SEPODES B.; VALA H.; ROCHA-PEREIRA P.; CORREIA DA SILVA G.; TEIXEIRA N.; SILVA AS.; CARVALHO L.; TEIXEIRA F.; DAS U.M. Exercise training decreases proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition*.25:330–339. 2009.
27. MARTIN-CORDERO L, GARCIA JJ, GIRALDO E, DE LA FUENTE M, MANSO R, ORTEGA E. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1beta and IFN gamma affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *European Journal of Applied Physiology*, 107(5):535-43. 2009.

28. YAMASHITA A.S; LIRA F.B; ROSA J.C.; PAULINO E.C; BRUM P. C.; *et al.* Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: The effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine*. 52:168–174. 2010.
29. MOHER D, LIBERATI A, TETZLAFF J, ALTMAN DG. The PRISMA Group (2009) Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS one Medicine*, 6(7), 2009.
30. HOOIJMANS CR, LEENAARS M & RITSKES-HOITINGA M. A Gold Standard Publication Checklist to Improve the Quality of Animal Studies, to Fully Integrate the Three Rs, and to Make Systematic Reviews More Feasible. *Atla*. 38: 167-182, 2010.

Tabela 1. Avaliação da qualidade metodológica dos estudos incluídos.

Autores/ ano/país	Randomização	Cegamento dos resultados	Análise Estatística
MORIGUCHI <i>et al.</i>, 1998. JAPÃO (16)	Não relatada	Não relatado	Adequada
TEIXEIRA DE LEMOS <i>et al.</i>, 2009 (PORTUGAL)	Relatada	Não relatada	Adequada
MARTIN-CORDERO <i>et al.</i>, 2009. ESPANHA	Não relatada	Não relatado.	Adequada
YAMASHITA <i>et al.</i>, 2010. BRASIL	Relatada	Não relatado	Adequada

Tabela 2. Características dos estudos elegíveis em ordem cronológica.

Autores/ ano/país	Modelo Animal	Idade do Animal	Treino	Intensidade Frequência/ Duração	Tecido alvo	Parâmetro Imune Avaliado
MORIGUCHI <i>et al.</i>, 1998. JAPÃO	Ratos Zucker obesos (fêmeas)	60- 365 dias	Esteira	Série de 8%: 3 sessões de 15 min a veloc.:15 m / min, descanso de 5 min. 5dias/semana; 40 semanas.	Linfócitos do baço (esplenócitos)	Células Natura- Killers (NK) e GLUT1.
	Obesidade genética					
TEIXEIRA DE LEMONS <i>et al.</i>, 2009 PORTUGAL	Ratos Zucker obesos (machos)	42 – 120 dias	Natação	1h/dia;3d/semana;11 semanas.	Sangue e pâncreas	IL-6, IL-10 e TNFα.
	Obesidade genética					
MARTIN- CORDERO <i>et al.</i>, 2009. ESPANHA	Ratos Zucker obesos (machos)	60 – 180 dias	Esteira	Moderado: 25 cm/s p 10 min a 35cm/s p 35 min; 5dias/semana; 14 semanas.	Macrófagos e linfócitos (peritônio)	IL-1 e IFNγ
	Obesidade genética			Agudo: 1sessão: 35 cm/s p 35 min.		
YAMASHITA <i>et al.</i>, 2010. BRASIL	Ratos Wistar (machos)	105 – 175 dias	Esteira	55% VO ₂ ; 60 min/dia; 5 dias/semana; 10 semanas.	Tecido adiposo branco - Adipócitos	IL-6, IL-10 e TNFα.
	Obesidade dietética					

GLUT-1: transportador de glicose-1; NK: células natural-killer; IL-6: interleucina-6;; IL-10: interleucina-10; TNFα: fator de necrose tumoral alfa; IFNγ: Interferon Gama.

Tabela 3. Delineamento Experimental dos estudos incluídos.

<u>Autores/ ano/país</u>	<u>Manejo laboratorial</u> <u>Tamanho do Grupo</u>	<u>Temperatura/Umididade</u>	<u>Luz</u>	<u>Nutrição/Água</u>
MORIGUCHI <i>et al.</i> , 1998. JAPÃO	+	+/-	+	+/+
TEIXEIRA DE LEMOS <i>et al.</i> , 2009. PORTUGAL	+	+/+	+	+/+
MARTIN-CORDERO <i>et al.</i> , 2009. ESPANHA	+	-/-	+	+/+
YAMASHITA <i>et al.</i> , 2010. BRASIL	+	+/+	+	+/+
TOTAL	4	2	4	8

 (+): relatada; (-): não relatada.

Tabela 4. Objetivos, resultados e conclusões dos estudos incluídos.

Autores/Ano/País	Objetivos	Resultados	Conclusões
MORIGUCHI <i>et al.</i>, 1998. JAPÃO	Investigar se o treinamento físico incrementa a função celular e melhora a expressão de GLUT-1 em linfócitos do baço	TF diminuiu a resposta mitógena de linfócitos esplênicos em ratos obesos ($p<0,01$), aumentou a expressão da GLUT-1; TF reduziu a atividade das células NK de esplenócitos ($p<0,05$)	TF reduz a atividade das células NK e resposta mitógena de linfócitos do baço e melhora a expressão da GLUT-1 nos linfócitos.
TEIXEIRA DE LEMOS <i>et al.</i>, 2009. PORTUGAL	Avaliar o efeito do exercício sobre os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e ácido úrico	EF reduziu a concentração de IL-6 ($p<0,001$) e TNF α ($p<0,05$)	Exercício aeróbico impede o desenvolvimento de inflamação crônica associada a T2D em pâncreas de ratos obesos
MARTIN-CORDERO <i>et al.</i>, 2009. ESPANHA	Verificar se o exercício moderado e o agudo melhoram os parâmetros de resposta inflamatória em distúrbios associados a SM.	Macrófagos peritoneais: EF moderado: não modificou a concentração de IL-1 β ($p<0,01$) e IFN γ Aumento só com o LPS e EF agudo: aumento de IL-1 β ($p<0,01$)	Exercício com duração e intensidade apropriada é uma ferramenta antiinflamatória.
YAMASHITA <i>et al.</i>, 2010. BRASIL	Analisar os efeitos do treinamento aeróbio e/ou restrição de energia em níveis de adipocinas no tecido adiposo branco	Redução nos níveis de IL-6 E TNF α ($p<0,05$) e adipocinas no tecido adiposo mesentérico	TF e restrição de energia não promoveram maior efeito antiinflamatório no tecido

GLUT-1: transportador de glicose-1; TF: treinamento físico; NK: células natural-killer; IL-6: interleucina-6; LPS: lipopolissacarídeos; TNF α : fator de necrose tumoral alfa; EF: exercício físico; T2D: diabetes tipo 2; IFN γ : Interferon Gama.

1.2 HIPÓTESES

- A utilização da dieta hiperlipídica em ratas jovens durante 12 semanas promove aumento da massa de gordura, com conseqüente aumento no peso corporal, levando à obesidade e alterações nos parâmetros:
 - Somáticos: aumento no comprimento naso-anal abdominal e índice de massa corpórea;
 - Imunes: redução na capacidade microbicida e fagocítica de macrófagos alveolares; Menor viabilidade das células e adesividade.
- O treinamento físico moderado atua na reversão do fenótipo de sobrepeso/ obesidade induzido pela dieta e otimiza a capacidade das células de defesa (macrófagos).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a repercussão do treinamento físico moderado nos parâmetros murinométricos e imunológicos em ratas, submetidas ou não, a uma dieta hiperlipídica.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analisar alterações murinométricas nos animais;
- Avaliar a série branca do sangue periférico;
- Analisar a taxa de fagocitose em macrófagos alveolares;
- Avaliar o índice de aderência de macrófagos alveolares;
- Quantificar a produção de óxido nítrico;
- Analisar a viabilidade celular de macrófagos alveolares.

CAPÍTULO 2

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Wistar (n=32), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, e instaladas no departamento de Anatomia, num biotério de ciclo claro-escuro da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo invertido de luz (18:00 às 06:00h) e escuridão (06:00 às 18:00h) constante. Matrizes com idade de 120 dias foram colocadas para acasalar (2 fêmeas /1 macho), fazendo-se o diagnóstico de gravidez através da aferição a cada 3 dias do peso corporal. Confirmado o estado de gestação, as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidade.

Um dia após o nascimento, os neonatos eram separados das respectivas mães para serem pesados e selecionados. Foram escolhidas fêmeas com peso entre 6,0 e 8,0 g, sendo sacrificadas ratas abaixo ou acima destes referidos limites de peso. Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias pós-natais (período de aleitamento). A partir do 21º dia de vida os filhotes foram separados das mães (desmame), ficando em gaiolas conjuntas (n=8 por gaiola) até o final dos experimentos. Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso à ração e água filtrada *ad libitum*.

O projeto seguiu as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê De Ética Em Experimentação Animal CEEA – UFPE, processo n° 23076.020153/2010-75.

2.2 Manipulação Nutricional

Inicialmente, os animais foram separados em dois grupos quanto ao regime dietético: Grupo Controle (**GC**) n=16 e Grupo Obeso (**GO**) n=16.

Grupo Controle (GC): Estes receberam dieta padrão do biotério Labina® - Purina Brasil, contendo (23% de proteínas) *ad libitum*. Esta dieta contém 358,48% calorias e 4,24 % de lipídios. Tabela 1.

TABELA 1. Composição centesimal da dieta padrão LABINA utilizada na alimentação dos animais.

NUTRIENTES/ CALORIAS	LABINA*(%)
Proteínas	23,27
Lipídios	4,24
Carboidratos	56,81
Cinzas	6,60
Fibras	8,00
Valor energético (cal) / 100g	3,58

*Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, LEEAL-DN/UFPE.

Grupo Obeso (GO): A indução da obesidade nos animais ocorreu após o desmame, até o final do protocolo de treinamento físico, durante 12 semanas, através de uma dieta hiperlipídica, uma mistura (normoprotéica e hiperlipídica), descrita e utilizada por Estadella *et al.* (2004). Ela possui como ingredientes ração LABINA®, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1 respectivamente. A mistura foi oferecida em forma de pelets e contém 480,84% calorias (Figura 2).

TABELA 2- Composição centesimal da dieta hiperlipídica/hipercalórica utilizada na alimentação dos animais.

NUTRIENTES/ CALORIAS	DIETA*(%)
Proteínas	17,93
Lipídios	24,50
Carboidratos	47,18
Cinzas	3,62
Umidade e substâncias voláteis	6,77
Valor energético (cal) / 100g	4,80

*Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos, LEAAL-DN/UFPE, 2008. Melo, 2010.



Figura 2 – Etapas de confecção da dieta hiperlipídica/hipercalórica. Fonte: MELO (2010).

2.3 Protocolo de Treinamento Físico Moderado

Aos 60 dias de idade, os animais foram subdivididos em 4 grupos: Controle-sedentário (**CS**) (n=8); Controle-treinado (**CT**) (n=8); Obeso-sedentário (**OS**) (n=8); Obeso-treinado (**OT**) (n=8) (Figura 3). Os animais do grupo treinado foram submetidos a um treinamento físico moderado de natação, adaptado de Nascimento *et al.*, (2004), que seguiu o protocolo experimental de 6 semanas, 5dias/ semana e 45 min/dia. Já os animais dos

grupos sedentários (CS e OS) foram submetidos a um estresse aquático, que consiste em animais dentro de uma gaiola com água com aproximadamente 5 cm de profundidade, no mesmo período (semanas, dias e tempo) dos treinados. Para controle do estresse térmico, todos os animais após saírem da água, permaneceram por cerca de cinco a oito minutos em câmara de aquecimento.

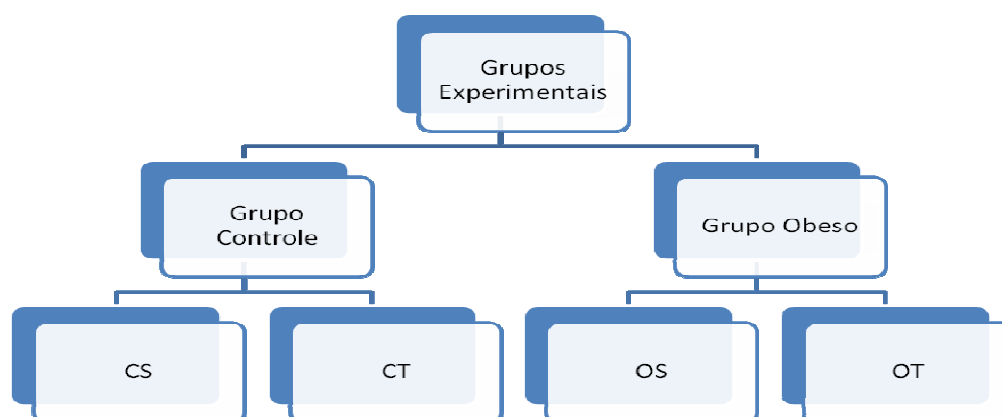


Figura 3: Fluxograma dos grupos experimentais (n=32), mediante estado nutricional e treinamento. . **GRUPOS:** **CS** – Controle Sedentário; **CT** – Controle Treinado; **OS** – Obeso Sedentário; **OT** – Obeso Treinado. Todos os grupos apresentaram n de 08 animais.

2.4. Delineamento Experimental

2.4.1 Avaliação do ganho ponderal

O peso corporal dos animais foi aferido após o desmame, até a fase adulta, intervalos de 10 dias entre as aferições, até o final do treinamento físico. Para isso, utilizamos uma balança eletrônica digital com capacidade para 4 Kg (Marte, modelo S-000).

2.4.2 Avaliações Murinométricas

Foi realizada a mensuração do comprimento naso-anal, índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee, aos 60, 80 e 100 dias de idade, conforme

descrito por Novelli *et al.*, 2007. Para o IMC, partimos da relação entre peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm²), o índice de Lee, pela fórmula: raiz cúbica do peso corporal (g) /eixo longitudinal do corpo (cm). Valores acima de 0,3 predizem obesidade. Os animais foram devidamente anestesiados para o procedimento do comprimento naso-anal, com medidas realizadas em papel milimetrado.

2.4.3 Análise das células sangue periférico

Amostras sanguíneas

Para coleta de amostras sangüíneas, os animais dos diferentes grupos ao início e final do protocolo de treinamento físico foram previamente anestesiados. A alíquota de sangue (1ml), foi obtida realizando-se um pequeno corte com bisturi na extremidade da cauda do animal e depositado em tubo de 5ml com uma gota (20 µl) de Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA. Foi obtida a contagem da série branca: leucócitos totais e diferenciais. Os dados foram processados pelo laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (ULAB- HC- UFPE).

Níveis de lactato

Ao início e imediatamente após o treino físico, o lactato foi coletado em semanas intervaladas (2^o, 4^o e 6^o semanas), amostras de sangue foram obtidas por uma pequena incisão na cauda do animal e depositadas em fitas de lactímetros, em aparelho da Accutrend Lactato® Roche.

3. Análise Dos Parâmetros Imunológicos

Ao fim do período de treinamento físico (24 horas após última sessão de treino), todos os animais foram anestesiados (urethane a 12,5% e cloralose a 0,5%) e sacrificados para coleta de macrófagos bronco-alveolares. Todos os procedimentos foram realizados na microbiologia do laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

3.1 Análise dos macrófagos do lavado bronco-alveolar (LBA)

3.1.1 Obtenção do LBA

O LBA foi obtido de acordo com a técnica usada por De Castro *et al.*, (1997). Sob anestesia, o animal foi submetido a um procedimento cirúrgico (traqueostomia) para exposição da traquéia. O LBA era realizado, por injeção de soro fisiológico (SF) à temperatura ambiente, através de cânula plástica inserida na traquéia. Pela traquéia, várias alíquotas de 3 ml de SF foram injetadas e aspiradas. Ao final, foi obtido um volume de 30 ml de LBA por cada animal (figura 4).

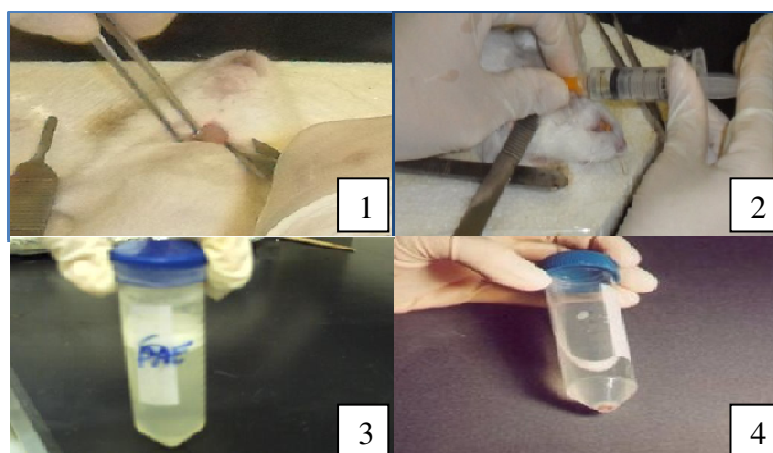


Figura 4 – Procedimentos de traqueostomia (1), alíquotas de LBA (2), LBA coletado (3), LBA após centrifugação (4). **Fonte: MELO, 2010**, foto 3 e 4, respectivamente.

3.2 Obtenção de células para cultura de macrófagos alveolares

O procedimento com os macrófagos foi realizado em capela de fluxo laminar objetivando não contaminar as culturas de células. O LBA foi centrifugado (15 min, a 1500 rpm) e as células foram recuperadas e contadas do precipitado. A contagem foi realizada em Câmara de Neubauer, com o corante azul tripan a 0.05%. O precipitado de células obtido do centrifugado do LBA foi ressuspensionado em um meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino inativado (3%; CULTILAB), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e anfotericina B (0.25 mg/ml) (SIGMA)

em uma densidade de 1×10^6 células/ml e foram colocados em placa com poços de 35 mm de diâmetro para cultura de tecido (1ml/poço, 6 poços; Falcon). Para adesão, as células foram mantidas na placa por 1h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO_2 . As células não aderentes eram descartadas. Posteriormente, as células aderentes à placa foram incubadas por mais 1 h em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) com antibióticos e sem soro fetal bovino.

3.3 Estudo da taxa de fagocitose

A técnica utilizada para obtenção e estudo da taxa de fagocitose baseou-se no trabalho de Malagueño *et al.* (1998).

3.4 Taxa de fagocitose em macrófagos

Na sequência, foram utilizados fungos (*Saccharomyces cerevisiae*) para o estudo da fagocitose. Os fungos foram lavados duas vezes com Solução tampão de fosfato (PBS) a 0,01M; contados 10^7 células em 200 μL de PBS e em seguida foram adicionados à suspensão de macrófagos (800 μL de RPMI 1640, com 1×10^6 células). Os fungos e os macrófagos juntos fizeram um volume final de 1mL (figura 5). As células (macrófagos e fungos) foram distribuídas em lâminas para microscopia óptica e incubados a 37°C , em atmosfera úmida por um período de 1 hora. Após este período as lâminas foram lavadas com SST e secadas a temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico, com objetiva de 100 sob imersão. A taxa foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 100 células.



Figura 5 – Preparo do fungo para a taxa de fagocitose. Fonte: MELO (2010).

3.5 Avaliação do índice de adesividade (IA)

Alíquotas do sobrenadante contendo células não aderentes, após a primeira hora da cultura, foram adicionadas ao corante azul Tripán e levadas para contagem das células em hemocitômetro. O IA foi calculado através da fórmula descrita por De La Fuente (1991). $IA = 100 - \text{células não aderidas/mL divididas por } n.^{\circ}\text{inicial de células/mL} \times 100$.

3.6 Produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares

Uma vez a adesão ocorrida na placa de cultivo, cada poço foi aspirado e lavado com 1mL de solução salina a 0,9%. As placas de cultura retornaram à estufa para posteriores leituras em espectrofotômetro, com 24 horas. A concentração de nitrito/nitrato, medida indireta da síntese de NO, foi calculada pela média de uma curva padrão e os dados foram expressos em $\mu\text{M/mL}$ de nitrito/nitrato.

Para efetuar a dosagem de óxido nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito e nitrato das amostras foi necessário realizar uma curva padrão. Para a construção desta, foram utilizados reagentes a base da solução de Nitrato de sódio (NaNO_2) 1mM de Solução Padrão, meio de cultura RPMI 1640 e reagente de Griess, pelo método de Ding (1998), em volumes pré-estabelecidos.

Construção da curva padrão

Quantidades crescentes da solução padrão foram adicionadas ao RPMI 1640 para se obter oito (08) soluções de diferentes concentrações. O quadro 1 descreve as quantidades pré-estabelecidas.

QUADRO 1 – Construção de curva padrão para dosagem de óxido nítrico.

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

Processo de revelação da curva padrão e das amostras

A confecção da curva padrão (QUADRO 1) ocorreu nos momentos das coletas das amostras, e as leituras tanto das amostras quanto da curva padrão eram efetuadas após o período de incubação de 24 horas. Para o procedimento das leituras, em espectrofotômetro, foi utilizado um comprimento de onda de 550 nm (Figura 6). Em seguida, retirados 100µL de cada solução da curva padrão e a mesma quantidade de amostras dos sobrenadantes das culturas de células e misturados a 100µL da solução de revelação, para então, após 10 minutos ser realizada a leitura. No grupo controle as células não receberam tratamento com o LPS. Neste grupo houve apenas 100µL de RPMI 1640 e 100µL solução de revelação.

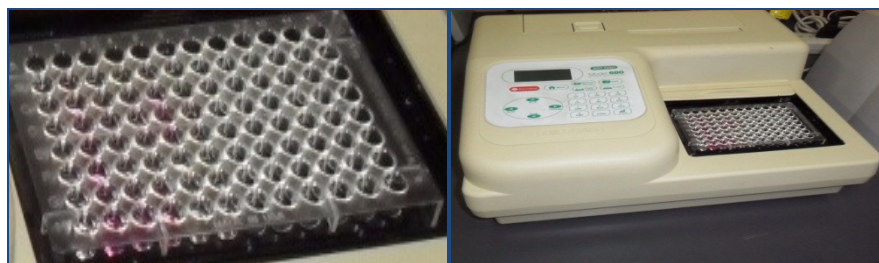


Figura 6: placa de leitura e espectrofotômetro.

A determinação espectrofotométrica dos níveis de nitrito e nitrato da curva padrão, assim como daqueles liberados nas amostras experimentais

foram registradas em absorbância. A partir da determinação dos valores da curva padrão foi possível converter os valores de todas as amostras e assim determinar a quantidade de nitrito e nitrato liberados pelas células dos animais dos diferentes grupos.

3.7 Viabilidade Celular (*MTT TEST*)

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl (MTT), a cristais de formazan, pelo reconhecimento dos níveis de atividade mitocondrial, de acordo com o método de Akao *et al.*, 1995.

Depois de recolhido o sobrenadante dos cultivos celulares, para a medida de nitritos, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg /ml) 200µl por poço durante 60 minutos a 37°C. Depois deste período foi retirado o meio e se adicionou o solvente orgânico, dimetil-sulfóxido (DMSO) +etanol (1:1) 200µl (podiam ser utilizadas outras combinações de solventes). O sobrenadante foi removido das placas de cultivo e posto em uma placa de ELISA onde a absorbância foi lida em espectrofotômetro de 550nm.

3.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15,0. Conforme a normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov), foi empregada a Análise de Variância (ANOVA *one way*), na comparação entre os diferentes grupos, para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa, foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância estatística considerada foi $p < 0,05$ em todos os casos.

CAPÍTULO 3

3. Referências Bibliográficas

ABBAS, AK, LICHTMAN, AH. *Imunologia Básica: Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico*. Editora Elsevier Ltda., Rio de Janeiro, 2ª edição, 354, 2007.

ADAMS GR, ZALDIVAR FP, NANCE DM, KODESH E, RADOM-AIZIK S, COOPER DM. Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity* 25:658-666, 2011.

AHIMA SR, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Trends of Endocrinology and Metabolism*, 8:327-32, 2000.

AKAO N, SUGIMOTO N, THU AM, KONDO K, TSUDA Y, FUJITA K. A tetrazolium dye (MTT) assay for testing larval viability using second- stage Larvae of *Toxocara canis*. *Journal of Parasitology* 44: 1-5, 1995.

ALI S, ULLAH F, JAN R. Effects of intensity and duration of exercise on differential leucocyte count. *Ayub Med Coll Abbotabad*. 2003;(15)35-7.

ALMEIDA PWM, GOMES-FILHO A, FERREIRA AJ, RODRIGUES CEM, DIAS-PEIXOTO MF, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. *Journal of Applied Physiology*, 107: 261–265, 2009.

ALVES MNR. Os efeitos da obesidade na resposta imune. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 21(4): 316-19, 2006.

AMERSFOOT ESV, BERKEL TJCV, KUIPER J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. *Clinical Microbiology Review*. 16(3):379-414, 2003.

AMORIM, MAF. Indução De Programação Fetal Pela Desnutrição E Pelo Treinamento Físico Em Ratos: Estudo De Parâmetros Somáticos E

Bioquímicos Em Fêmeas E Sua Prole. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal de Pernambuco. 2009.

ANGELI A, MINETO M, DOVIO A, PACCOTI P. The overtraining syndrome in athletes a stress-related disorder. *Journal of Endocrinology Investigation*, 27; 603-12, 2004.

BACURAU RF, BELMONTE MA, SEELAENDER MC, COSTA RLF. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochemistry And Function*, 8: 249-58, 2000.

BARROS KMFT, MANHÃES-DE-CASTRO R, SOUZA SL, MATOS RJB, DEIRÓ TCBJ, CABRAL-FILHO JE, CANON F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutritional Neuroscience*, 9: .99-104, 2006.

BATISTA FILHO M, A RISSIN. [Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends]. *Cadernos de Saúde Pública*, 19 (1);S181-91. 2003.

BAUM M, LIESEN H, ENNEPER J. Leucocytes, lymphocytes, activation parameters and cell adhesion molecules in middle-distance runners under different training conditions. *International Journal of Sports Medicine*, 15 (S 3):122-6, 1994.

BENER, A, M ZIRIE, M MUSALLAM, YS KHADER, AO AL-HAMAQ. Prevalence of Metabolic Syndrome According to Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation Criteria: A Population-Based Study. *Metabolic Syndrome Related Disorders*, Mar 25. 2009.

BERNARDES D, MANZONI M SJ, SOUZA, CP, TENÓRIO N, DÂMASO AR. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo

de recuperação ao exercício em ratos. *Revista Brasileira de Educação Física e Esportes*, 18 (2):191-200, 2004.

BODGAN C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2(10): 907-16, 2001.

BRENNER I, SHEK PN, ZAMECNIK J, SHEPHARD RJ. Stress Hormones and the immunological responses to heat and exercise. *International Journal of Sports Medicine*, 10: 130-143, 1998.

BRENNER IK *et al.* Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Revista Paulista de Medicina*, 121 (1): 9-14, 2003.

CAMPBELL PT, WENER MH, SORENSE B, WOOD B, CHEN-LEVY Z, *et al.* Effect of exercise on in vitro immune function: a 12-month randomized, controlled trial among postmenopausal women. *Journal of Applied Physiology*, 104:1648-1655, 2008.

CESCHI M, GUTZWILLER F, MOCH H, EICHHOLZER M, PROBST-HENSCH NM. Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Swiss Medicine Wkly*, 137(3-4):50-6, 2007.

CHANDRA RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(2): 460-3, 1997.

COSTA ROSA LFPB, VAISBERG MW. Influências do exercício na resposta imune. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 8 (4), 2002.

COSTA ROSA LF. Exercise as a time-conditioning effect in chronic disease: a complementary treatment strategy. Evidence Based on Complement Alternative Medicine, 1:63–70, 2004.

DAS UN. Exercise and inflammation. *European Heart Journal*, 27:1385, 2006.

DE CASTRO CMMB, DE CASTRO RM, ANDRADE AD, BRANDT CT. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. *Anais da Faculdade Médica Universidade Federal de Pernambuco* 42 (2): 78-83, 1997.

DE LA FUENTE M, DEL RIO M, FERRANDEZ MD, HERNANZ A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 73(2):205-11, 1991.

DELMONDES, G. M. B., Repercussão do treinamento físico moderado e intenso nos mecanismos de defesa de ratos adultos desnutridos precocemente. [Dissertação de mestrado]. *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, 2009.

DELVES PJEI, M ROITT. The immune system. First of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 343 (1): 37-49, 2000.

DIEMEN VV, TRINDADE EM, TRINDADE MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* 21:425-29, 2006.

DING AH, NATHAN CF, STUEHR J. Release of nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 141: 2407–2412, 1988.

DOS SANTOS RVT, MELLO ECCMT, COSTA ROSA LFBP. Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. *European Journal of Applied Physiology*, 107:309–315, 2009.

DUARTE ACGO, FONSECA DF, MANZONI MSJ, SOAVE CF, SENE-FIORESE M, DAMASO AR, CHEIK NC. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Revista de Nutrição*, 19(3): 341-8, 2006.

EGUCHI R, CHEIK NC, OYAMA LM, do NASCIMENTO CMO, MELLO MT de, TUFIK S, DAMASO A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 14 (3): 182-7, 2008.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DAMASO AR, RIBEIRO EB, DO NASCIMENTO CMO. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Basic Nutrition Investigation*, 20: 218-224, 2004.

FALAGAS ME, KOMPOTI M. Obesity and infection. *The Lancet Infection Diseases* 6 (7):438-46, 2006.

FEDIUC S, CAMPBELL JE, RIDDELL MC. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of Applied Physiology*, 100:1867-75, 2006.

FERREIRA CKO *et al.* Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clinics* 65(11):1167-1173, 2010.

FERREIRA E SILVA WT. Programação pela desnutrição perinatal do controle serotoninérgico da liberação de óxido nítrico por macrófagos alveolares em ratos adultos. [Tese de Doutorado]. Recife. *Universidade Federal de Pernambuco*, 2008.

FILHO FFR, MARIOSAS LS, FERREIRA SRG, ZANELLA MT. Gordura Visceral e Síndrome Metabólica: Mais Que Uma Simples Associação. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica*, 50 (2): 230-238, 2006.

FISBERG, M. Primeiras palavras: uma introdução ao problema do excesso de peso. In: Atualização em obesidade na infância e na adolescência. *Ateneu*: São Paulo, 1:1-9, 2004.

FLORA FILHO, R, ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46 (3):265-71, 2000.

FRANCISCHI, R. P.; PEREIRA, L. O.; LANCHI JR., A. H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: Revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Revista Paulista de Educação Física*, 15 (2):117-40, 2001.

GAÍVA, M.H.G., COUTO, R.C., OYAMA, L.M., CUTO, G.E.C., SILVEIRA, V.L.F., RIBEIRO, E.B., NASCIMENTO, C.M.O., Polyunsaturated fatty acids rich diets: effects on adipose tissue metabolism in rats. *British journal of nutrition* 86:371-7, 2001.

GARCIA C, DE OLIVEIRA MC, VERLENGIA R, CURI R, PITHON-CURI TC. Effect of dexamethasone on neutrophil metabolism. *Cellular Biochemistry of Function*, 21:105-11, 2003.

GHAEMMAGHAMI, F.; A. SASSOLAS; G. GAUQUELIN; R. FAVIER; M. VINCENT; J. SASSARD; C. GHARIB. Swim training in genetically hypertensive rats of the Lyon strain: effects on plasma lipids and lipoproteins. *Journal of Hypertension*, 4 (3):319-24. 1986.

GLEESON M. Immune system adaptation in elite athletes. *Current Opinion in Clinical Nutritional and Metabolic Care*, 9:659–665, 2006.

GLEESON M, BISHOP NC, STENSEL DJ, LINDLEY MR, MASTANA SS, et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews*, 11: 607-15, 2011.

GOKHALE R, CHANDRASHEKARA S, VASANTHAKUMAR KC. Cytokine response to strenuous exercise in athletes and non-athletes—an adaptive response. *Cytokine* 40: 123–12, 2007.

GUERRA LF, PRADO WL, CHEIK NC, VIANA FP, BOTERO JP, *et al.* Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. *Lipids in Health and Disease*, 6:16, 2007.

HEATH GW, FORD ES, CRAVEN TE *et al.* Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections. *Medicine Science of Sports and Exercise*, 23:152-7, 1991.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2003medidas/ppo2003medidas.pdf>, 2006.

IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf, 2010.

JUNGERSTEN, L.; AMBRING, A.; WALL, B.; WENNMALM, A. Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *Journal of Applied Physiology*, 82 (3):760–764, 1997.

KHAN LK, BOWMAN BA. Obesity: a major global public health problem. *Annual Review of Nutrition*, 19: 13–17, 1999.

KIM H., SHIN MS, KIM SS, LIM BV, KIM HB, *et al.* Modulation of immune responses by treadmill exercises in Sprague- Dawley rats. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 43:99-104, 2003.

KRETSCHMER BD, SCHELLING P, BEIER N, LIEBSCHER C, TREUTEL S, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences*, 76: 1553–73, 2005.

LAKKA TA, LAAKSONEN DE, LAKKA HM, MANNIKKO N, NISKANEN LK, et al. Sedentary lifestyle, poor cardiorespiratory fitness, and the metabolic syndrome. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 35(8):1279-86, 2003.

LAMAS O, MARTINEZ JA, MARTI A. T helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. *Nutrition Research* 22:496-507, 2002.

LEANDRO CG, NASCIMENTO E, MANHÃES-DE-CASTRO R, DUARTE JÁ, DE CASTRO CMMB. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 2(5):80-90, 2002.

LEANDRO CG, LEVADA AC, HIRABARA SM, et al. A program of moderate physycal training for Wistar rats based on maximal oxigen consumption. *Journal of Strength and Conditioning Research*, .21 (3): 751-6, 2007.

LEVY-COSTA RB, SICHIERI R, PONTES NS, MONTEIRO CA. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Revista de Saúde Pública*, 39 (4):530-40, 2005.

MALAGUENO E, ALBUQUERQUE C, DE CASTRO CMMB, GADELHA M, INÁCIO-IRMÃO J, SANTANA JV. Effect of biomphalaria straminea plasma of biomphalaria glabrata hemolymph cells. *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 93(1):301-2, 1998.

MARCOS A, NOVA E, MONTERO A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1):S66-9,2003.

MARTÍ A, MARCOS A, MARTINEZ JA. Obesity and immune function relationships. *Obesity Reviews*, 2: 131-40, 2001.

MÁRTON IJ, KISS C. Protective and destructive immune reactions in a apical periodontitis. *Oral Microbiology Immunology*, 15: 139-50, 2000.

MELO, K. F. S. Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos [Dissertação de mestrado]. *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, 2010.

MOULIN CM, MARGUTI I, PERON JPS, RIZZO LV, HALPERN A. Impact of adiposity on immunological parameters. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica* 53 (2): 2009.

MORIGUCHI S, KATO M, SAKAI K, YAMAMOTO S, SHIMIZU E. Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *American Journal of Clinical Nutrition*. 67(6):1124-9, 1998.

MUÑOZ, M.; MAZURE, R. A.; CULEBRAS, J. M. Obesidad y sistema inmune. *Nutrición Hospitalaria*, 19 (6):319-324, 2004.

MURPHY EA, DAVIS JM, BARRILLEAUX TL, MCCLELLAN JL, STEINER JL, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine*, 55; 274-279, 2011.

NASCIMENTO, E.; CAVALCANTE, T.; PEREIRA, S.; PALMEIRA, A.; ROCHA, M. C.; VIANA, M. T. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto* 4,(3): 26-33; 2004.

NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal*, 6: 3051–3064, 1992.

NAVARRO F, BACURAU AVN, ALMEIDA SS, BARROS CC, MORAES MR, et al. Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochemistry And Function*, 28: 266–273, 2010.

NERY, C. S; PINHEIRO, I. L; MUNIZ, G. S; VASCONCELOS, D. G. A; FRANÇA, S. P; NASCIMENTO, E. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 17 (1):49-55, 2011.

NIEMAN DC, HENSON DA, SAMPSON CS, HERRING JL, SUTTLES J, CONLEY M, et al. The acute immune response to exhaustive resistance exercise. *International Journal of Sports in Medicine*, 16:322-328, 1995.

NIEMAN, D.C. Prolonged aerobic exercise, immune response, and risk of infection. In:Exercise and Immune Function. *CRC Press*,143-161; 1996.

NIEMAN DC, PEDERSEN BK. Exercise and Immune Function: Recent Development. *Sports Medicine*, 27(2): 73-80, 1999.

NIEMAN, D.C. Is infection risk linked to exercise workload? *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32:406-411, 2000.

NIELSEN, H.B. Lymphocyte responses to maximal exercise: a physiological perspective. *Sports Medicine*,11(33):853-67, 2003.

NOVELLI, E. L. B.; DINIZ, Y. S.; GALHARDI, C. M.; EBAID, RODRIGUES, G. M. X.; MANI, F.; FERNANDES, CICOGNA , A. A. H.; A. C.; and NOVELLI FILHO,J. L. V. B. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, 41: 111–119, 2007.

O'KEEFE RJ, TEOT LA, SINGH D, PUZAS JE, ROSIER RN, HICKS DG. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Laboratory Investigation*, 76(4):457-65, 1997.

PEDERSEN KB E HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiology Reviews*, 80 (3): 1055-1081, 2000.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHETA Jr., A .H. Obesidade: Hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica* 47:111-127, 2003.

PORTO SMMS. Efeito do treinamento físico moderado em parâmetros metabólicos e imunológicos de ratos adultos obesos [Tese de doutorado]. *Universidade Federal de Pernambuco*, Recife, 2011.

SAMARTÍN, S, CHANDRA, RK. Obesity, overnutrition and the immune system. *Nutrition Research*, 21;243-62, 2001.

SAMPEY BP, VANHOSE AM, WINFIELD HM, FREEMERMAN AJ, MUEHLBAUER MJ, *et al.* Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*, 19: 1109–1117, 2011.

SMITH AG, SHERIDAN PA, HARP JB, BECK MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *Journal of Nutrition*, 137(5):1236-43, 2007.

TEIXEIRA DE LEMOS E.; REIS F.; BAPTISTA S.; PINTO R.; SEPODES B.; VALA H.; ROCHA-PEREIRA P.; CORREIA DA SILVA G.;TEIXEIRA N.; SILVA AS.; CARVALHO L.; TEIXEIRA F.; DAS U.M. Exercise training decreases

proinflammatory profile in Zucker diabetic (type 2) fatty rats. *Nutrition*, 25:330–339. 2009.

TJONNA, A. E.; LEE, S. J.; ROGNMO, O.; STOLEN, T. O.; BYE, A., *et al.* Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation*, 118: 346-54. 2008.

ZAMBON L, DUARTE FO, FREITAS LF, SCARMAGNANI FRR, DAMASO A, DUARTE ACGO, *et al.* Efeitos de dois tipos de treinamento de natacao sobre a adiposidade e o perfil lipidico de ratos obesos exogenos. *Revista de Nutrição*, 22:707-15, 2009.

ZHOU *et al.* Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity, 108 (7): 2867-72, 2011.

WALSH, N. P. *et al.* Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exercise and Immunology Reviews*, 17:1–65, 2011a.

WOODS JA, DAVIS JM, SMITH JA, NIEMAN DC. Exercise and cellular innate immune function. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31(1): 57-76, 1999.

WOODS JA, VIEIRA VJ, KEYLOCK KT. Exercise, Inflammation, and Innate Immunity. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 29:381–393, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? Geneva. Introduction, *Standing Committee on Nutrition News* 29: 3-4, 2005.

YAMASHITA A.S; LIRA F.B; ROSA J.C.; PAULINO E.C; BRUM P. C.; *et al.* Depot-specific modulation of adipokine levels in rat adipose tissue by diet-induced obesity: The effect of aerobic training and energy restriction. *Cytokine*. 52:168–174. 2010.

CAPÍTULO 4

4. **Artigo 1** – A ser submetido ao periódico: Journal of Applied Physiology. ISSN (impresso): 0021-8987.

REPERCUSSÕES DO TREINAMENTO FÍSICO MODERADO SOBRE A RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES *IN VITRO* DE RATAS OBESAS

EFFECTS OF MODERATE PHYSICAL TRAINING ON THE IMMUNE RESPONSE IN ALVEOLAR MACROPHAGES *IN VITRO* OF OBESE RATS

Patrícia Clara Pereira dos Santos¹, Maria do Amparo Andrade², Glívia Maria Barros Delmondes³, Maria Patrícia Pereira Melo⁴, Sílvia Regina Arruda de Moraes⁵, Célia Maria Machado Barbosa de Castro⁶.

¹ Mestrado em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE;

² Docente do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco e Doutora em Enfermidades Tropicais - Universidade de Salamanca –Espanha;

³ Mestre em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE;

⁴ Mestre em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE;

⁵ Docente do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE e Doutora em Ciências Morfofuncionais pela Universidade de São Paulo – USP, SP.

⁶ Docente do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE e Doutora em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará - UFCE, CE.

Correspondência: Patrícia Clara Pereira dos Santos. Universidade Federal de Pernambuco. Boa Vista – Recife – PE - Brasil – CEP: 50050-200. Telefone: (81) - 21268000 - e-mail: patriciaacps@yahoo.com.br.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar as alterações imunológicas que possam ter relação com a obesidade e com o treinamento físico moderado e suas repercussões. Foram utilizadas ratas *Wistar* fêmeas que após o 21º dia pós- natal foram divididas em dois grupos, segundo o regime dietético empregado: Grupo Controle (GC) (n=16) e Grupo Obeso (GO) (n=16). Aos 60º dias pós- natal, metade dos animais de cada grupo foi submetida ao treinamento físico. Ao término do protocolo de treino físico, após 24 horas, os animais foram anestesiados e submetidos ao procedimento cirúrgico de traqueostomia para análise do sistema imune. Foram efetuados os seguintes estudos: coleta e análise das células dos macrófagos alveolares. *In vitro*: Cultura dos macrófagos foi avaliada: taxa de fagocitose, índice de aderência e produção de óxido nítrico. Observou-se aumento no peso corpóreo e gordura visceral em animais submetidos à dieta hipercalórica e redução da mesma quando treinados. Verificou-se maior taxa de fagocitose, índice de adesividade e produção do óxido nítrico nos animais treinados. Em suma, a natação reverteu o fenótipo de sobrepeso promovido pela dieta hiperlipídica e atenuou os efeitos desta no sistema imunológico, melhorando a resposta imune dos macrófagos.

Palavras- chave: **dieta hiperlipídica; exercício físico; imunidade; macrófagos alveolares.**

ABSTRACT

The present study aimed to investigate the immunological changes that may be related to obesity and physical training and its repercussions. Female Wistar rats were used that after the 21th postnatal day were divided into two groups according to the dietary regimen used: Control Group (CG) (n = 16) and obese group (OG) (n = 16). At the 60th postnatal days, half the animals in each group was subjected to physical training. At the end of the protocol of physical training, after 24 hours the animals were anesthetized and underwent the surgical procedure of tracheotomy for analysis of the immune system. We performed the following studies: collection and analysis of cells from alveolar macrophages. In vitro: Culture of macrophages was evaluated: phagocytosis rate, index of adhesion and nitric oxide production. An increase in body weight and visceral fat in animals subjected to caloric diet and reduce it when trained. A higher rate of phagocytosis, an index of adhesiveness and nitric oxide production in trained animals. In short, swimming reversed the phenotype of overweight promoted by high fat diet and attenuated the effects of the immune system, improving the immune response of macrophages.

Keywords: **fat diet; exercise; immunity; alveolar macrophages.**

INTRODUÇÃO

Evidências na literatura sugerem ser a obesidade uma doença crônica inflamatória [1]. Sua etiologia é um processo multifatorial que envolve aspectos ambientais e genéticos [2], decorrente de mudanças dos hábitos de vida, tais como, alimentação inadequada e sedentarismo. Para o estudo experimental do sobrepeso/obesidade, diferentes metodologias podem ser empregadas, sendo a indução pela dieta a mais utilizada [2,3,4,5]. Estudo com animais submetidos à dieta hiperlipídica relata aumento na adiposidade, intolerância à glicose, além de inflamação [6]. Foram observados também linfopenia e menor resposta mitógena dos esplenócitos [7].

Segundo Kretschmer et al. [8] há íntima associação entre adiposidade abdominal e hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, os quais podem estar relacionados a alterações em vários aspectos imunológicos [9]. Aumento de gordura corporal promoveu uma maior contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes [10] indicando alteração na imunidade. Contudo, o exercício físico é também outro fator que altera o sistema imune, dependente da duração, frequência e intensidade do esforço [11,12]. Os mecanismos associados a alterações imunológicas são multifatoriais e correlacionam com diversos sistemas, endócrino ou nervoso [12].

A relação entre exercício físico e saúde vem se consolidando nos últimos anos. Diversos trabalhos relacionando seus efeitos sobre as funções do sistema imunológico

[10,11,13,15]. Há mesmo um consenso que o treinamento físico protege contra alguns tipos de infecções e câncer [13,16,17]. Em humanos, exercício físico moderado aumentou a resistência a infecções respiratórias do trato superior (ITRS), em mulheres submetidas à caminhada [18]. O que confere ao exercício aeróbio um potencial antiinflamatório [13]. Estas alterações imunológicas ocorrem em diversos compartimentos do organismo, tais como, pele, tecido da mucosa do trato respiratório superior, músculo, sangue e peritônio [20].

Os macrófagos são sensíveis aos efeitos do estresse via receptores para glicocorticoides [22], além de secretarem citocinas que irão agir em órgãos neuroendócrinos [23]. Os macrófagos são mediadores da resposta imune inata e agem como primeira linha de defesa contra os microorganismos [24]. São ativados durante uma resposta inflamatória, a partir de patógenos ou citocinas e liberam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como o óxido nítrico (ON), que é responsável pela defesa local dos pulmões [25] e tem ação microbicida e tumoricida *in vitro* [26]. Estudos relacionando exercício e produção de óxido nítrico (ON) na imunidade são recentes na literatura [14,26].

Nas últimas décadas, houve um crescimento considerável da obesidade no sexo feminino [27], seja entre mulheres jovens em países europeus [28], ou brasileiras, por alta ingestão de lipídios [29]. Levando a um aumento na publicação de estudos relacionados a esta população [10,29,30]. Neste contexto, a indução da obesidade por meio de uma dieta palatável após o desmame associada à prática de treinamento físico parece ser de interesse. Diante do exposto, este estudo se propôs a avaliar a evolução ponderal e a influência nos parâmetros imunológicos de ratas submetidas à dieta hiperlipídica e que foram submetidas ao treinamento físico moderado de natação.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

ANIMAIS

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Wistar (n=32), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição, num biotério de ciclo claro-escuro invertido da

Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, num ciclo de luz (18:00 às 06:00h) e escuridão (06:00 às 18:00h) constante. Durante todo o experimento, os animais tiveram acesso à ração e água filtrada *ad libitum*. O projeto seguiu as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê De Ética Em Experimentação Animal CEEA – UFPE, processo n° 23076.020153/2010-75.

MANIPULAÇÃO NUTRICIONAL

Inicialmente, os animais foram separados em dois grupos quanto ao regime dietético: Grupo Controle (**GC**) $n=16$ e Grupo Obeso (**GO**) $n=16$. **Grupo Controle (GC)**: Estes receberam dieta padrão do biotério Labina® - Purina Brasil, contendo (23% de proteínas) *ad libitum*. Esta dieta contém um valor energético de 3,58 cal/100g. **Grupo Obeso (GO)**: A indução da obesidade nos animais ocorreu após o desmame, até o final do protocolo de treinamento físico, por 12 semanas de administração, através de uma dieta hiperlipídica, descrita e utilizada por Estadella et al. [05]. A mistura foi oferecida em forma de pelets e valor energético de 4,80 calorias/100g.

TREINAMENTO FÍSICO

Aos 60 dias de idade, os animais foram subdivididos em 4 grupos: Controle-Sedentário (**CS**) ($n=8$); Controle-Treinado (**CT**) ($n=8$); Obeso-Sedentário (**HO**) ($n=8$); Obeso-Treinado (**OT**) ($n=8$) (Figura 3). Os animais do grupo treinado foram submetidos a um treinamento físico moderado de natação. Adaptado de Nascimento et al. [15] que seguiu o protocolo experimental de 6 semanas, 5 dias/ semana e 45 min/dia. Já os animais dos grupos sedentários foram submetidos a um estresse aquático no mesmo período (semanas, dias e tempo) dos treinados. Para controle do estresse térmico, todos os animais após saírem da água, permaneceram por cerca de cinco a oito minutos em câmara de aquecimento.

PESO CORPORAL E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL

Foi realizada a mensuração do comprimento naso-anal, e índice de massa corporal (IMC), aos 100 dias de idade, conforme descrito por Novelli et al. [31].

Utilizou-se a relação para o IMC do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm²) [31]. Os animais foram devidamente anestesiados para o procedimento do comprimento naso-anal, com medidas realizadas em papel milimetrado.

AVALIAÇÃO DA GORDURA VISCERAL

Os animais foram eutanasiados aos 105 dias pós-natal. Foi utilizada uma mistura dos anestésicos cloralose e urethane, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5%, via intraperitoneal, na proporção de 1mL/100g de peso corporal. Após procedimento de aquisição das células imunes, foi realizada uma incisão na região abdominal, onde os órgãos foram retirados e a gordura visceral separada e pesada em balança eletrônica Marte (ASF11).

AVALIAÇÃO DO LACTATO SANGUÍNEO

Ao início e imediatamente após o treino físico, o lactato foi coletado em semanas intervaladas (2º, 4º e 6º semanas), amostras de sangue foram obtidas por uma pequena incisão na cauda do animal e depositadas em fitas de lactímetros, em aparelho da Accutrend Lactato® Roche.

ANÁLISE DO SISTEMA IMUNE

CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO

Foi coletada ao final do protocolo de treinamento físico (24horas após a última sessão de exercício) uma pequena alíquota de sangue (1 ml) da cauda dos animais, devidamente anestesiados, para contagem total e diferencial de leucócitos do sangue. O sangue foi depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido de uma gota (20 µl) do anticoagulante Ácido Etileno Diamino Tetra Acético a 3% - EDTA. Utilizou-se o hemocítômetro do laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (ULAB- HC- UFPE).

OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (LBA)

Para obtenção do LBA, utilizou-se um procedimento cirúrgico (traqueostomia), para aquisição de alíquotas de lavado bronco alveolar de cada animal [32]. Várias alíquotas de solução fisiológica foram injetadas e aspiradas na traqueia e o material recolhido (LBA) foi depositado em tubo estéril.

CULTURA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES

O LBA foi centrifugado (15 min, a 1500 rpm) e as células foram recuperadas e contadas do precipitado. Para a contagem foi realizada em Câmara de Neubauer, com o corante azul tripan a 0.05%. O precipitado de células obtido do centrifugado do LBA foi ressuscitado em um meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) suplementado com soro fetal bovino inativado (3%; CULTILAB), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e anfotericina B (0.25 mg/ml) (SIGMA) em uma densidade de 1×10^6 células/ml e foram colocados em placa com poços de 35 mm de diâmetro para cultura de tecido (1ml/poço, 6 poços; Falcon). Para o processo de adesão, as células foram mantidas na placa por 1h a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. As células não aderentes eram descartadas. Posteriormente, as células aderentes à placa foram incubadas por mais 1 h em meio de cultura (RPMI 1640, CULTILAB) com antibióticos e sem soro fetal bovino.

TAXA DE FAGOCITOSE

Na sequência, foram utilizados fungos (*Saccharomyces cerevisiae*) para avaliar a taxa de fagocitose pelo método de Malagueño et al. [33]. Os fungos foram lavados duas vezes com Solução tampão de fosfato (PBS) a 0,01M; contados 10^7 células em 200µL de PBS e em seguida foram adicionados à suspensão de macrófagos (800µL de RPMI 1640, com 1×10^6 células). Os fungos e os macrófagos juntos fizeram um volume final de 1mL. As células (macrófagos e fungos) foram distribuídas em lâminas para microscopia óptica e incubados a 37°C, em atmosfera úmida por um período de 1 hora. Após este período as lâminas foram lavadas com SST e secadas a temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico, com objetiva de 100 sob imersão. A taxa foi obtida como

percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 100 células.

ÍNDICE DE ADESIVIDADE

Alíquotas do sobrenadante contendo células não aderentes, após a primeira hora da cultura, foram adicionadas ao corante azul Tripan e levadas para contagem das células em hemocítmetro. O IA foi calculado através da fórmula : $IA = 100 - \frac{\text{células não aderidas/mL}}{n.^{\circ}\text{inicial de células/mL}} \times 100$ [34].

PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Uma vez a adesão ocorrida na placa de cultivo, cada poço foi aspirado e lavado com 1mL de solução salina a 0,9%. As placas de cultura retornaram à estufa para posteriores leituras em espectrofotômetro, com 24 horas. Para efetuar a dosagem de óxido nítrico através da quantificação dos níveis de nitrito e nitrato das amostras foi necessário realizar uma curva padrão. Para a construção desta foram utilizados reagentes a base da solução de Nitrato de sódio (NaNO_2) 1mM de Solução Padrão, meio de cultura RPMI 1640 e reagente de Griess de acordo com a técnica de Ding, [35] em volumes pré-estabelecidos. A concentração de nitrito/nitrato, medida indireta da síntese de ON, foi calculada pela média de uma curva padrão e os dados foram expressos em $\mu\text{M/mL}$ de nitrito/nitrato.

VIABILIDADE CELULAR (MTT TEST)

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl) a cristais de formazan, pelo reconhecimento dos níveis de atividade mitocondrial, de acordo com o método de Akao et al. [36]. Depois de recolhido o sobrenadante dos cultivos celulares, para a medida de nitritos, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg /ml), 200 μl por poço de cultura, durante 60 minutos a 37°C. Após este período foi retirado o meio e adicionou-se o solvente orgânico, dimetil sulfoxido (DMSO) + etanol (1:1), 200 μl . O sobrenadante foi removido das placas de cultivo e postos em uma placa de ELISA e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de 550nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa estatístico software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15,0. Conforme a normalidade dos dados

(Kolmogorov-Smirnov), foi empregada a Análise de Variância (ANOVA *one way*), na comparação entre os diferentes grupos, para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa, foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si. A significância estatística considerada foi $p < 0,05$ em todos os casos.

RESULTADOS

Ao final de 12 semanas, o consumo de dieta hiperlipídica aumentou o peso corporal, de forma significativa, além da gordura visceral no grupo obeso-sedentário (OS) ($p = 0,002$), em comparação com o grupo treinado (OT), e em relação ao controle sedentário (CS) ($p = 0,000$). Enquanto que o treino físico reduziu o estoque de tecido adiposo no OT ($p = 0,002$) em relação ao sedentário. Quanto ao índice de massa corpórea (IMC), a dieta hiperlipídica aumentou de forma significativa no OS ($p = 0,000$) comparado ao controle. Ao término do protocolo de treinamento físico, o OT apresentou redução no IMC, ($p = 0,005$) em relação ao seu par sedentário. O comprimento naso-anal (CNA) não demonstrou diferenças significativas entre os grupos (**Tabela 1**).

Verificou-se alteração significativa dos valores dos linfócitos apenas entre os grupos treinados, OT e CT ($p = 0,014$) em comparação aos sedentários. Com relação aos neutrófilos houve aumento no número absoluto entre OS e CS ($p = 0,021$) pelo efeito da dieta e redução entre OT em relação ao OS ($p = 0,024$), efeito do treinamento físico. Contudo, o número de eosinófilos não obteve significância na comparação intra e inter grupos. Os basófilos apresentaram diferença significante entre OS e OT ($p = 0,042$), OS e CS ($p = 0,002$) e CS e CT ($p = 0,015$). Para os monócitos, significância apenas entre o grupo OS e OT ($p = 0,024$). Não houve alteração significativa para os demais grupos (**Tabela 2**).

O nível de lactato obtido confirma que o exercício foi moderado (CT $\pm 3,47$ e OT $\pm 3,94$), valores de referência (2- 4 mmol). O estudo da taxa de fagocitose por macrófagos alveolares do LBA foi determinado através do percentual de células (macrófagos) que fagocitaram os fungos (*Saccharomyces cerevisiae*). Os grupos treinados apresentaram maiores valores e diferença significante em relação aos seus pares sedentários, OT ($52,29 \pm 0,94$) em relação ao OS ($46 \pm 0,58$) ($p = 0,002$) e CT ($54,14 \pm 0,59$) em comparação com CS ($46,7 \pm 1,54$), $p = 0,000$. Para os demais grupos, não houve diferença significativa (**Figura 1**).

Houve aumento no índice de adesividade em animais treinados, entretanto não teve diferença significativa entre os grupos, OS ($91,9 \pm 2,7$) em relação ao OT ($93,0 \pm 2,4$) e CS ($93,4 \pm 3,0$) em relação a CT ($94,4 \pm 1,2$) (**Figura 2**). A produção de ON *in vitro* em meio de cultura não - estimulado ($\emptyset$) foi maior para os grupos treinados, e OT ($p=0,000$) em relação aos sedentários. Entre os animais treinados, houve efeito da dieta hiperlipídica ($p=0,002$). Para os demais não houve diferença significativa. Em meio de cultura estimulado por lipopolissacarídeos (LPS), a produção de ON foi maior também para os grupos submetidos ao treino físico, CT ($p=0,014$) e OT ($p=0,000$). Para as demais comparações não houve significância (**Tabela 3**).

A viabilidade celular dos macrófagos alveolares em meio de cultura foi em torno de 89% e não houve diferença significativa entre os grupos.

DISCUSSÃO

Neste estudo, ao término de 12 semanas de administração dietética, o peso corporal dos animais foi alterado de forma significativa, além de aumento na adiposidade visceral nas ratas submetidas à dieta hiperlipídica em relação à controle. O mesmo verificado por Estadella et al. [5], entretanto, em diferentes estudos não houve alteração no peso corpóreo, mas aumento na gordura visceral [2,4,6,37]. O que denota eficaz em promover a obesidade exógena [5]. Com relação ao índice de massa corpórea (IMC), revelou-se maior nos obesos sedentários que nos treinados, achado semelhante ao de Nery et al. [38]. O treinamento físico atenuou este efeito, com tendência de redução do estoque de tecido adiposo em animais treinados, o mesmo observado em outros estudos [2,4, 37,38]. Possivelmente, o treino físico promoveu maior mobilização dos estoques de lipídios [39], e gasto energético [38]. Segundo Dâmaso et al. [39], há uma maior atividade da enzima lipase de lipoproteínas, que reduzem o volume das células adiposas.

Observou-se valores de linfócitos, neutrófilos, basófilos e monócitos maiores para o grupo obeso treinado. Não houve alteração quanto ao número de eosinófilos. Aumento da gordura corporal promoveu uma maior contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes [10] indicando alteração na imunidade decorrente da obesidade. Estudo de Nascimento et al [15] tiveram achados distintos, com a diminuição dos linfócitos e aumento dos neutrófilos em animais submetidos ao exercício e estresse. Entretanto, animais submetidos ao exercício físico intenso observaram-se aumento dos linfócitos e redução dos neutrófilos [39]. Em diferentes

estudos, o exercício físico não promoveu alterações nas concentrações de monócitos, eosinófilos e basófilos [15,39].

Estas diferenças de resultados se devem a diferentes tipos de protocolo de treinamento, duração, intensidade e frequência [11]. Receptores presentes nas células do sistema imune são susceptíveis a diversos hormônios do estresse, como os glucocorticóides (cortisol, β -endorfinas) e as catecolaminas [50]. A expressão destes receptores promove a base para a ação das catecolaminas. Entretanto, vale ressaltar que a densidade dos receptores adrenérgicos é distinta nos vários tipos de células imunes [50]. O que confere possível influência destes mediadores na função das células imunes durante o treinamento.

Foi verificado nesta pesquisa um aumento na taxa de fagocitose em macrófagos de ratos treinados em relação aos sedentários. Os macrófagos são células efectoras (fagocíticas), reguladas por outras células (linfócitos T e B) e mediadores químicos produzidos pelo eixo hipotálamo- pituitária-adrenal (HPA) e sistema nervoso simpático (SNS) [45]. Relacionam-se com atividade fagocítica, antitumoral, tem função auxiliar na apresentação de antígenos e promovem a imunidade mediada por linfócitos [21,44,50]. Achados semelhantes foram observados em outros estudos com animais treinados [15,43-45]. Treinamento físico moderado (6 semanas, 5dias/semana) promoveu incremento na fagocitose de macrófagos alveolares[15] e peritoneais [40,41]. Entretanto, exercício agudo também elevou a capacidade fagocítica [26]. Estas respostas podem ser decorrentes de alterações metabólicas, como também pelo estresse oxidativo decorrente de treinamentos físicos extenuantes [13,21]. Nesse sentido, é reconhecido que o treino físico prolongado em atletas de elite promovem maior susceptibilidade à infecções do trato respiratório superior (ITRS)[10,17,19].

Estas controvérsias ocorrem devido a diferentes protocolos de treino físico que induzem respostas distintas no aumento de hormônios de estresse e citocinas [12]. Costa Rosa [22] estabelece um elo entre o exercício físico e o sistema imune que se daria por 2 vias: mecanismo metabólico (glutamina) e o neuroendócrino (imunomodulação). Segundo dos Santos et al. [43], o treinamento físico promove um aumento no metabolismo e consumo de glutamina, que modula a função do macrófago. A redução de glutamina no plasma pode correlacionar com aumento dos sintomas de ITRS [46], como em atletas submetidos a treino físico extenuante, promovendo imunossupressão [16, 18]. A elevada concentração de ácidos graxos

pode inibir a proliferação dos linfócitos T, devido à diminuição da captação de glicose pelos linfócitos (GLUT-1) [9].

Contudo, outros estudos relatam que os fatores neuroendócrinos são responsáveis pelo estresse induzido pelo treino no sistema imune [12]. O treinamento físico extenuante aumenta a circulação hormônios de estresse como a adrenalina, cortisol, hormônio do crescimento e prolactina, que tem efeitos imunomoduladores [18,40,50]. Os efeitos antiinflamatórios do exercício físico podem induzir certo grau de imunossupressão [17]. A presença de glicocorticóides em culturas de macrófagos resulta na inibição de algumas funções microbicidas, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN)[45].

Neste estudo, verificamos aumento da produção de ON por macrófagos estimulados ou não com LPS, *in vitro*, em animais treinados em relação aos sedentários. Achado similar foi relatado no estudo de Sugiura [26] que observou aumento na produção de ON macrófagos de animais submetidos ao treinamento físico de esteira (8 semanas, 3 vezes por semana). Algumas pesquisas revelam que o exercício físico estimula o ON [45,47]. Treino físico moderado promove aumento da aderência, taxa de metabolismo do nitrogênio, e a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais [43,44]. Entretanto, treinamento intenso também elevou a produção de ON [48], este aumento pode estar ligado a uma elevação do metabolismo e do consumo de oxigênio, produzido por treino de alta intensidade.

Segundo Woods et al. [44], o exercício físico tem potente efeito estimulador sobre o metabolismo de nitrogênio e reatividade de oxigênio. Conforme Jungersten et al. [47], ocorre uma elevação transitória de nitrato do plasma, provavelmente por causa do aumento temporário do desenvolvimento endógeno do ON, provocado por uma única sessão de treino. É importante salientar que apesar dos benefícios do óxido nítrico como molécula reguladora do sistema imune [49] em situações de estresse oxidativo, processos inflamatórios, o NO pode reagir diretamente ou associado a outros compostos e se tornar citotóxico [49]. Com relação ao IA, os animais treinados obtiveram maiores valores em relação aos seus pares sedentários. O exercício físico pode induzir aumento na quimiotaxia, na aderência e na fagocitose dos macrófagos mesmo após um único exercício [26]. Não foram relatadas evidências na literatura relacionando índice de aderência e viabilidade celular as diferentes variáveis de obesidade e treino físico moderado.

Conclusão

Observamos neste estudo que a dieta hiperlipídica aumentou os estoques de gordura visceral nos animais. O sistema imune sofreu influências frente à obesidade, reduzindo a capacidade oxidativa e microbicida dos macrófagos alveolares. Entretanto, o treinamento físico moderado atenuou estes efeitos, reduziu a quantidade de adiposidade e proporcionou melhora no mecanismo de defesa, com o aumento na taxa de fagocitose e produção de óxido nítrico.

Referências

1. CESCHI M, GUTZWILLER F, MOCH H, et al (2007). Epidemiology and pathophysiology of obesity as cause of cancer. *Sw Med Wkly*, 137(3-4):50-6
2. EGUCHI R, CHEIK NC, OYAMA LM et al (2008). Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. *Rev Bras Med Esp* 14 (3): 182-7
3. ZHOU *et al* (2011) Signaling mechanisms in the restoration of impaired immune function due to diet-induced obesity. *PNAS* 108 (7): 2867-72
4. ZAMBON L, DUARTE FO, FREITAS LF et al (2009) Efeitos de dois tipos de treinamento de natacao sobre a adiposidade e o perfil lipidico de ratos obesos exógenos. *Rev Nutr*, 22:707-15
5. ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DAMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; DO NASCIMENTO, C.M.O. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Bas Nutr Invest*, 20: 218-224, 2004.
6. SAMPEY BP, VANHOSE AM, WINFIELD HM et al (2011) Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obes* 19: 1109–1117
7. LAMAS O, MARTINEZ JA, MARTI A (2002) T helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. *Nut Res* 22:496-507

8. KRETSCHMER BD, SCHELLING P, BEIER N, et al (2005) Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Lif Sci* 76: 1553–73
9. MORIGUCHI S, KATO M, SAKAI K, et al (1998) Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). *Am J Clin Nut.* 67(6):1124-9
10. NIEMAN DC e PEDERSEN BK (1999) Exercise and Immune Function: Recent Development. *Sp Med* 27(2): 73-80
11. LEANDRO CG, LEVADA AC, HIRABARA SM et al (2007) A program of moderate physycal training for Wistar rats based on maximal oxigen consumption. *J Str Cond Res* 21 (3): 751-6
12. PEDERSEN KB e HOFFMAN-GOETZ L (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Phys Rev* 80 (3): 1055-1081
13. MURPHY EA, DAVIS JM, BARRILLEAUX TL, et al (2011) Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cyt* 55; 274-279.
14. FERREIRA C.K.O. et al (2010) Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clin* 65(11):1167-1173
15. NASCIMENTO E, CAVALCANTE T, PEREIRA S, et al (2004) O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Rev Port Ciên Desp* 4,(3): 26-33.
16. NIEMAN DC (2000) Is infection risk linked to exercise workload? *Med and Sci Sp and Ex*, 32:406-411, 2000.
17. WALSH NP et al (2011a) Position statement. Part one: immune function and exercise. *Ex Imm Rev* 17:1–65.

18. NIEMAN DC, HENSON DA, SAMPSON CS et al (1995) The acute immune response to exhaustive resistance exercise. *Int J Sp Med* 16:322-328, 1995.
19. WALSH NP et al (2011b) Position statement. Part two: Maintaining immune health. *Ex Imm Rev* 17:64–103
20. ANGELI A, MINETO M, DOVIO A et al (2004). The overtraining syndrome in athletes a stress-related disorder. *J End Inv* 27; 603-12
21. WOODS JA, DAVIS JM, SMITH JA et al (1999) Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sp Ex* 31(1): 57-76
22. COSTA ROSA LF (2004) Exercise as a time-conditioning effect in chronic disease: a complementary treatment strategy. *Evid Bas Compl Alt Med* 1:63–70
23. WOODS JA, VIEIRA VJ, KEYLOCK KT (2009) Exercise, Inflammation, and Innate Immunity. *Imm All Clin N Am* 29:381–393
24. DELVES PJ e ROITT IM (2000) The immune system. First of two parts. *The New Eng J Med* 343 (1): 37-49
25. NATHAN C (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 6: 3051–3064
26. SUGIURA H, NISHIDA H, SUGIURA H et al (2002) Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Act Phys Scand* 174: 247–256
27. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2005) Overweight and obesity - a new nutrition emergency? *Gen Intr Stand Comm Nutr News* 29: 3-4
28. THÜMLER K, BRITTON A, KIRCH W et al (2009) Data and Information on Women's Health in the European Union. *Eur Comm* 11-57

29. FRANCISCHI RP, PEREIRA LO, LANCHA Jr (2001). Exercício, comportamento alimentar e obesidade: Revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. *Rev Paul Ed Fís*15 (2):117-40
30. CAMPBELL PT, WENER MH, SORENSE B et al (2008) Effect of exercise on in vitro immune function: a 12-month randomized, controlled trial among postmenopausal women. *J Appl Phys* 104:1648-1655
31. NOVELLI ELB, DINIZ YS, GALHARDI CM, et al (2007) Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 41: 111–119
32. DE CASTRO CMMB, DE CASTRO RM, ANDRADE AD et al (1997) LPS bacteriano: um mediador de inflamação. *An Fac Med Univ Fed Pern* 42 (2): 78-83
33. MALAGUENO E, ALBUQUERQUE C, DE CASTRO CMMB et al (1998) Effect of biomphalaria straminea plasma of biomphalaria glabrata hemolymph cells. *Mem Inst Osw Cr. RJ* 93(1):301-2.
34. DE LA FUENTE M, DEL RIO M, FERRANDEZ MD et al (1991) Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Imm* 73(2):205-11
35. DING AH, NATHAN CF, STUEHR J (1988) Release of nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Imm* 141: 2407–2412
36. AKAO N, SUGIMOTO N, THU AM et al (1995) A tetrazorium dye (MTT) assay for testing larval viability using second- stage Larvae of *Toxocara canis*. *J Paras* 44: 1-5
37. BERNARDES D, MANZONI MSJ, SOUZA CP, et al (2004) Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Rev Bras Ed Fis Esp*18 (2):191-200

38. NERY CS, PINHEIRO IL, MUNIZ GS et al (2011) Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev Bras Med Esp* 17 (1):49-55
39. DAMASO AR, OLLER DO NASCIMENTO CM (1998) Efeitos do exercício realizado durante o ciclo reprodutivo sobre o metabolismo lipídico: análise de estudos utilizando animais experimentais. *Rev Paul Ed Fis.* 12:54-70
40. NIEMAN DC (1996) Prolonged aerobic exercise, immune response, and risk of infection. In: *Exercise and Immune Function*. CRC Press 143-161
41. ROGATTO GP, LUCIANO E (2002) Perfil leucocitário de ratos submetidos ao exercício resistido crônico. *Biosc J* 18 (1):51-63
42. FERREIRA CKO et al (2010) Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clin* 65(11):1167-1173
43. DOS SANTOS RVT, MELLO ECCMT, COSTA ROSA LFBP (2009) Effect of exercise on glutamine metabolism in macrophages of trained rats. *Eur J Appl Phys* 107:309–315
44. WOODS JA, LU Q, CEDDIA MA et al (2000) Exercise-induced modulation of macrophage function. *Imm Cell Biol* 78: 545–553
45. CASTELL L (2003) Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. *Sp Med* 33:323–345
46. BRONWYN AK (2000) Nitric oxide-mediated metabolic regulation during exercise: effects of training in health and cardiovascular disease. *FASEB J.* 14: 1685-1696
47. JUNGERSTEN L, AMBRING A, WALL B et al (1997) Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Phys* 82 (3):760–764
48. BODGAN C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Imm* 2(10): 907-16

49. DUSSE LS, VIEIRA LM, CARVALHO M et al (2003) Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Pat Med Lab* 39(4):343-350
50. LEANDRO CG, NASCIMENTO E, MANHÃES-DE-CASTRO R et al (2002) Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Rev Port Ciên Desp* 2(5):80-90

Tabela 1. Efeito da dieta hiperlipídica e do treinamento físico aos 105 dias pós-natal, sobre parâmetros murinométricos e gordura visceral em ratas Wistar adulto jovens (Anova one way) com post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

Grupos	n	Peso	IMC g/cm ²	CNA (cm)	Gordura Visceral (g)
CS	7	233,4±2,68	0,51±0,01	21,42±0,17	9,59±0,55
CT	8	237,3±5,25	0,53±0,01	21±0,13	9,15± 0,59
OS	8	250,3*±2,84	0,56*±0,00	21,21±0,09	15,14*±0,54
OT	8	240,6±9,9	0,53 [#] ±0,01	21,21±0,25	11,85 [#] ± 1,05

GRUPOS: **CS** – Controle Sedentário; **CT** – Controle Treinado; **OS** – Obeso Sedentário; **OT** – Obeso Treinado. Dados em Média±EPM; Significância estatística: Efeito dieta, intergrupos (*) e efeito treino intragrupos (#).

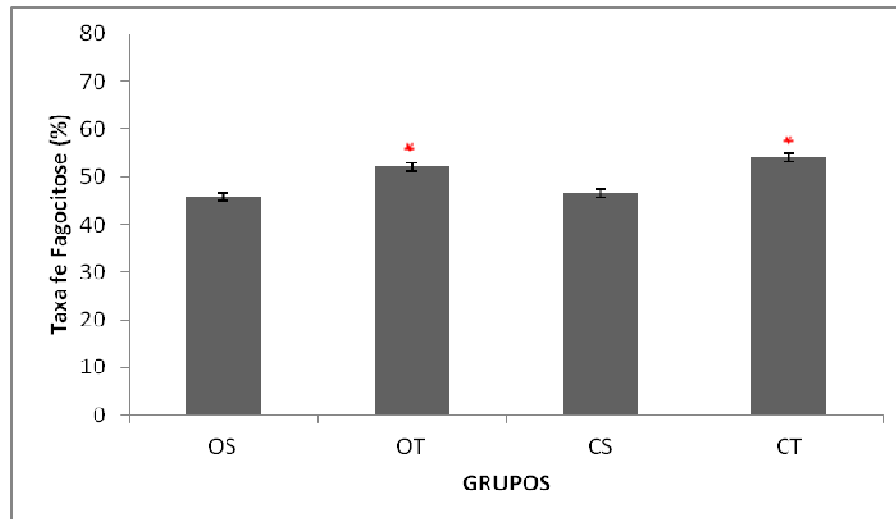


Figura 1. Taxa de Fagocitose em macrófagos alveolares após a realização do programa de Treinamento Físico. **GRUPOS:** **OS** – Obeso Sedentário; **OT** – Obeso Treinado; **CS** – Controle Sedentário; **CT** – Controle Treinado. Dados como média± EPM. (ANOVA *one way*) com post-hoc de Turkey ($p<0,05$).

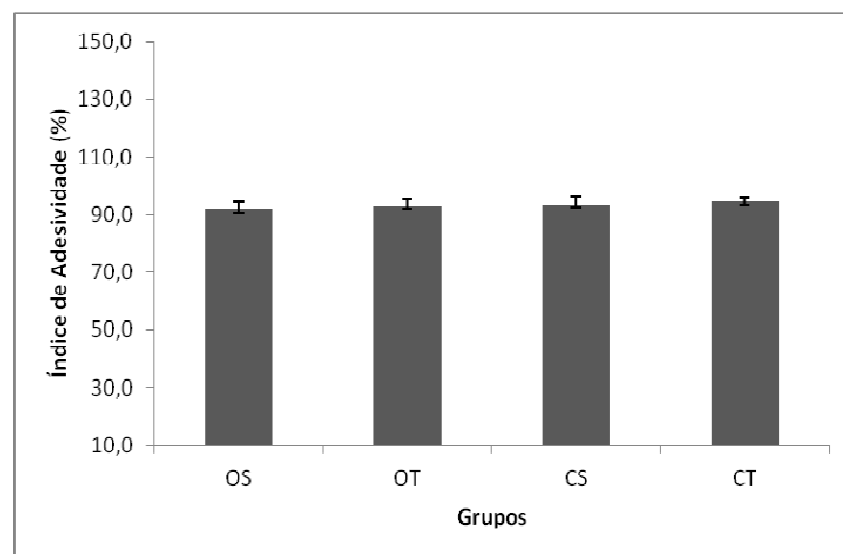


Figura 2. Índice de Adesividade (IA) obtida aos 105 dias pós-natais. **GRUPOS:** **OS** – Obeso Sedentário; **OT** – Obeso Treinado; **CS** – Controle Sedentário; **CT** – Controle Treinado. Dados como média± EPM. (ANOVA *one way*) com post-hoc de Turkey ($p<0,05$).

Tabela 3- Análise da produção de óxido nítrico pelos macrófagos alveolares, em meio de cultura, estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) ou não ($\emptyset$), após realização do protocolo de treinamento físico. ANOVA (*one way*) com post-hoc de Turkey ($p < 0,05$).

Grupos	$\emptyset$	LPS
CS	2,3 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,4
CT	3,6 [#] $\pm$ 0,5	6,5 [#] $\pm$ 1,0
OS	2,4 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,3
OT	6,8 ^{#*} $\pm$ 0,9	8,7 [#] $\pm$ 0,5

Dados (mM/mL) expressos em Média $\pm$ EPM; Significância estatística: Efeito dieta, intergrupos (*) e efeito treino intragrupos (#).

CAPÍTULO 5

5. Considerações Finais

Nossos resultados contribuem para atestar os benefícios provenientes do treino físico moderado nos parâmetros imunológicos mesmo em animais obesos. Os achados encontrados denotam a importância do treinamento moderado na redução da adiposidade e melhora da resposta imune pelos macrófagos alveolares.

Ainda que animais submetidos à dieta hiperlipídica tivessem diminuição na função macrofágica, o treino atenuou este quadro, com incremento da atividade fagocítica, oxidativa e microbicida dos macrófagos alveolares decorrentes do exercício. As adaptações fisiológicas e funcionais provenientes do treinamento físico moderado podem auxiliar o organismo contra agentes infecciosos e doenças crônicas. Contudo, vale ressaltar a importância de intensidade, duração e frequência adequadas para evitar efeitos imunossupressores.

Além disso, há necessidade de mais estudos experimentais, baseados em protocolo de treinamento padronizado, como também análise do superóxido e dosagem de marcadores inflamatórios correlacionados à obesidade e ao treinamento físico, em diferentes períodos de administração.

ANEXO 1
Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE

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



Recife, 26 de maio de 2010.

Ofício nº 273/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Maria do Amparo Andrade**
Departamento de Fisioterapia - UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.020153/2010-75

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, ***"Treinamento físico moderado: efeitos sobre características bioquímicas, hematológicas e imunes em ratas normais e obesas."***

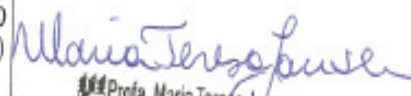
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

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

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE; Animais: Ratos Wistar, Sexo: Fêmeas; Idade: 90 a 120 dias. Número de animais previsto no projeto: 32 (trinta e dois) animais.

Atenciosamente,


Profª. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA



ANEXO 2

Normas do programa de Pós-graduação em Fisioterapia da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia
Nível: Mestrado
Av. Jom. Aníbal Fernandes - Cidade Universitária
CEP: 50740-560- Recife - PE
Fone/fax: (81) 21268937
www.ufpe.br/ppgfsioterapia
ppgfsioterapia@ufpe.br

FORMATO PADRÃO PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

A dissertação deve obrigatoriamente apresentar os seguintes itens:

- ✓ Deverá ser escrita em espaço 1,5 entre linhas, letra tipo Arial, tamanho 12.
- ✓ Capa, sumário, agradecimentos, resumo e abstract devem ser mantidos e se necessário listas de tabelas, figuras e abreviaturas.
- ✓ Não há necessidade de listas e tabelas, figuras e abreviaturas.
- ✓ As diferentes seções serão nomeadas como capítulos (Capítulo 1 – Introdução; Capítulo 2 – Material e Métodos; Capítulo 3 – Referências Bibliográficas, Capítulo 4 – Artigo, Capítulo 5 – Considerações Finais, contendo as conclusões e/ou recomendações advindas do trabalho).
- ✓ Introdução no mesmo formato da tradicional, porém com limite de número de páginas.
- ✓ Metodologia detalhada com limite de números de páginas.
- ✓ Observação: o número de páginas utilizadas com a introdução e a metodologia não deverá exceder 50 (somatório das duas). O conteúdo da introdução e da metodologia deve ficar restrito aos resultados que serão apresentados no(s) artigo(s).
- ✓ Referências bibliográficas relativas à introdução e à metodologia, nas normas da ABNT (a publicação "Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas" - Ed. UFMG, de Júnia Lessa França et al., 8ª edição (2009) deverá servir de referência para as normas ABNT).
- ✓ Artigo(s) conforme normas do periódico para o qual o mesmo será enviado. O limite de páginas assim como o tipo e tamanho da fonte, espaçamento e outras considerações relativas à formatação, deverão seguir as normas de instruções aos autores.
- ✓ O(s) artigo(s) poderá ser escritos em português, inglês ou espanhol, desde que de acordo com as normas da revista.
- ✓ Considerações finais, contendo no máximo três páginas.
- ✓ Anexo 1: Aprovação do Comitê de Ética.
- ✓ Outros anexos e apêndices considerados importantes (e.g. ficha de registro dos dados, questionários, planilha de dados, etc.) desde que o número total de páginas utilizadas com os anexos não ultrapasse 20 páginas.

Anexo 3

Submissão do Artigo 1 – Revista Brasileira de Medicina do Esporte

Sra Patrícia Clara Pereira dos Santos,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS EM ANIMAIS OBESOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA." para Revista Brasileira de Medicina do Esporte. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

URL do Manuscrito:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbme/author/submission/83455>

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email.

Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Submissões ativas

Submissão concluída. Agradecemos seu interesse em contribuir com seu trabalho para a revista Revista Brasileira de Medicina do Esporte.

» [Submissões ativas](#)

Submissões Ativas

ATIVO ARQUIVO					
ID	MM-DD ENVIADO	SEÇÃO	AUTORES	TÍTULO	SITUAÇÃO
RBME-1233	02-29	TF AR	Pereira dos Santos	INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO NOS PARÂMETROS...	Aguardando designação
1 a 1 de 1 itens					
Iniciar nova submissão CLIQUE AQUI para iniciar os cinco passos do processo de submissão.					

AUTIX

Submissões

Ativo (1)

Arquivo (0)

[Nova submissão](#)

IDIONA

Português (Brasil)

NOTIFICAÇÕES

[Visualizar](#)

[Gerenciar](#)