



Alterações Morfológicas Esplénicas Induzidas Por Um Programa de Treinamento Exhaustivo em Ratos Wistar

Dissertação académica apresentada com o objetivo de obter o grau de mestre em Atividade Física e Saúde pela Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, ao abrigo do artigo 20º do Decreto-Lei nº74/2006 de 24 março, na redação dada pelo Decreto-Lei nº65/2018 de 16 de agosto.

Supervisor: José Alberto Ramos Duarte, MD, PhD

Sara Nobre Maia

Porto, 2020

MAIA, S.N. (2020). *Alterações Morfológicas Esplénicas Induzidas Por Um Programa de Treinamento Exaustivo em Ratos Wistar*. Mestrado em Atividade Física e Saúde. Faculdade de Desporto da Universidade do Porto, Portugal.

Palavras-Chave: Exercício; estresse mecânico; sistema imune; baço; histologia.

FONTES DE FINANCIAMENTO

O estudo experimental apresentado nesta dissertação foi apoiado e realizado no **Centro de Investigação da Atividade Física, Saúde e Lazer (CIAFEL)**, sediado na Faculdade de Desporto da Universidade do Porto (FADEUP), Porto, Portugal.



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu de
Desenvolvimento Regional



Aos meus pais,
Sérgio Maia (in memoriam) e Vanda Nobre,
minha irmã e meu amor.

AGRADECIMENTOS

É nessas horas que passa um filme na cabeça, de todo o caminho percorrido, das memórias que serão levadas, do aprendizado, não somente o aprendizado técnico científico como também o aprendizado de vida e para a vida. Nada disso seria possível ou teria o real valor se não tivesse pessoas ao meu lado nessa caminhada, e para isso, gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram nessa fase tão importante de minha vida, cada uma de forma tão especial e importante e pra mim.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. José Alberto Ramos Duarte**. Obrigada professor, por toda atenção, por todo o conhecimento que me tens passado, eu, uma jovem inexperiente aprendi tanto com o senhor, da fisiologia à pesquisa, e, sem saber me ensinou valores que levarei a vida toda. Quero exaltar aqui além do seu conhecimento, qualidades admiráveis; humildade, sabedoria e um coração muito bom, são pessoa como o senhor que levo como referência de vida e de profissão. Obrigada!

À **Celeste Maria Resende dos Santos**, nossa dona Celeste. Obrigada pela paciência ao me ensinar e me deixar aprender as atividades do laboratório e principalmente, por todo cuidado e preocupação que teve comigo nessa etapa longe de casa, o carinho e abraço da senhora foram importantes para deixar o caminho mais fácil. Brinco com a senhora ao dizer que parecia a nossa mãe e de facto foi mesmo uma segunda mãe pra mim. Agradeço não só em meu nome, mas em nome da minha família. Que a saúde, o brilho e risada que só a senhora tem e que me alegrava em dias mais difíceis perdure por muito anos. A ti, minha eterna gratidão.

Aos meus colegas de laboratório e de sala de aula, **Grace Nunes, Beshoy Girgis, Francisco Leite, Paula Pirá, Ana Mendes, Catarina Cardoso, Maurílio Dutra, Toni Bovolini, Jussara Mesquita** e aos colegas da “sala ao lado”, **Giorjines Boppre e Maria Ruas**, obrigada a todos, pelas risadas e momentos partilhados, alguns deles criei grandes laços de amizade que levarei

comigo sempre. Meu agradecimento ao **Prof. Hélder Fonseca** a quem também aprendi muito com seu conhecimento, ética e profissionalismo.

A minha grande amiga e saudosa **Édyla Camelo**, morávamos tão pertinho uma da outra no Brasil e só nos conhecemos do outro lado do oceano, foi afinidade e confiança de primeira, obrigada por todas as conversas, histórias e momentos partilhados, seu grande coração e sua risada nunca serão por mim esquecidos, mesmo a vida nos pregando peças, acredito que um dia nos reencontraremos novamente, até breve minha amiga.

Aos meus velhos amigos, que mesmo na distância se fizeram presentes, seja nas palavras de apoio ou torcida, **Rony Lima, Jéssica Lopes, Igor Sousa, Viviane Almeida, Jayane Mara, Sílvia Almeida e Laerton Guerra**, obrigada pelos anos de amizade e companheirismo sincero, com certeza nosso caminho se torna mais próspero e alegre quando se tem pessoas do bem e de verdade ao nosso lado.

Eu não poderia deixar de agradecer a família Portuguesa que me abriu as portas de seu lar e me recebeu tão bem, **D^a Lurdes** e o seu esposo **Sr. Lima**, quanto amor tens em vossa família, eu me senti em casa estando ao lado de pessoas do bem e tão acolhedoras, D^a Lurdes sempre muito cuidadosa e preocupada. Agradeço a Deus por tê-los colocado nessa jornada, agradeço também em nome da minha família que ficaram menos preocupados por saberem que estava sendo bem acolhida e segura em vossa casa.

Agradeço a **Rodrigo Teles**, a pessoa que escolhi para trilhar a vida comigo. Obrigada, por todo apoio em dias mais difíceis, obrigada por acreditar em mim e nos meus planos, foste meu alicerce, meu colo, meu ombro amigo, seu cuidado e companheirismo foram fundamentais para que tudo isso ocorresse, essa conquista é nossa, meu amor.

Agradeço a minha mãe **Vanda Nobre** e minha irmã **Camille**, isso tudo é por vocês, vocês são minha força, minha base e sem vocês não sou nada. Obrigada por acreditarem em mim. Aos meus avós e tias símbolos de força, com vocês eu nunca esquecerei minhas origens e raízes.

E pra finalizar, agradeço a **Deus**, que me rege e me guarda nas mais vastas tempestades, meu acalento, meu melhor amigo. “Eu, porém, cantarei sobre o teu poder; cada manhã, cantarei com alegria sobre o teu amor” Sl. 59/16. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti Senhor. Te agradeço com toda a força da minha alma.

“Até aqui o Senhor me sustentou”.

ÍNDICE GERAL

FONTES DE FINANCIAMENTO	V
AGRADECIMENTOS	IX
ÍNDICE GERAL	XIII
LISTA DE FIGURAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS	XXI
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 OBJETIVOS	5
1.1.1 Objetivo geral.....	5
1.1.2 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO II	7
2. Revisão da literatura	9
2.1 Inatividade física e exercício físico	9
2.2 Introdução ao Sistema imunológico	10
2.2.1 Sistema imune inato	10
2.2.3 Sistema Imune Adquirido	11
2.3 Exercício e sistema imune	13
2.3.1 Efeito do exercício agudo intenso no sistema imunológico	14
2.3.2 Efeito do exercício moderado na fase aguda e crónica.....	17
2.4 NF-κB	18
2.5. Síndrome do Overtraining	19
2.5.1. Definição.....	19
2.5.2. Sintomas.....	20
2.5.3. Prevalência	20
2.5.4. Diagnóstico	21
2.5.5 Prevenção e tratamento.....	22
2.5.6 Th1/Th2	22
2.6 Baço e exercício físico	23
CAPÍTULO III	27

1. ESTUDO EXPERIMENTAL	29
Splenic morphologic changes induced by a strenuous and exhaustive training program in Wistar rats	29
CAPÍTULO IV	53
1. CONCLUSÕES GERAIS	55
CAPÍTULO V	57
1. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Principais componentes da imunidade inata; barreiras físicas, componentes celulares e proteínas do complemento 11

Figura 2.3 - Curva em forma de J. Esse modelo sugere que o exercício aeróbio regular quando feito de forma moderada diminui o risco de infecção, e que, exercício de alta intensidades com durações prolongadas pode aumentar esse risco..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 2.3.1 - “Janela aberta”- Durante esse período de disfunção imune que pode durar de 3 e 72 horas, ocasionado pelo exercício prolongado, a entrada de bactérias e vírus fica facilitada, aumentando o risco de infecção clínica e subclínica **Erro! Marcador não definido.**

Figura 2.6. - Comparação da PB entre roedores e humanos. As principais diferenças encontram-se na zona marginal, a zona marginal do baço em humanos apresentam uma zona interna e externa seguido de uma zona perifolicular..... 24

CAPÍTULO III - ESTUDO EXPERIMENTAL

Figura 1- Indicadores de peso corporal, ingestão alimentar e peso relativo do baço para o CG e grupo exercitado. A) peso corporal durante o experimento; B) ingestão de alimentos por animal; C) peso relativo do baço (%). * $p < 0,05$ CG vs. EG1. # $p < 0,05$ EG1 vs. EG3..... **Erro! Marcador não definido.**

Figura 2- Áreas esplénicas do grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1) e terceira semana (EG3). Área total de polpa branca (A). Área da zona marginal (B). Área folicular (C) e área total da polpa vermelha. * $p < 0,05$ CG vs. EG3. # $p < 0,05$ EG1 vs. EG3. Os valores são apresentados em mediana e percentis (25-75). **Erro! Marcador não definido.**

Figura 3- Na parte superior, cortes histológicos do baço. Grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1) e terceira semana (EG3). Imagens representativas dos diferentes níveis de organização da polpa branca em relação à polpa vermelha corada com hematoxilina eosina. Ampliação x400. O gráfico ilustra as frequências relativas dos diferentes graus de organização da

polpa branca nos diferentes grupos; CG, EG1 e EG3. * $p < 0,05$..**Erro! Marcador não definido.**

Figura 4 - Células T esplénicas CD4⁺. No topo, imunomarcação para expressão de linfócitos esplénicos CD4⁺ com aumento de $\times 400$. Grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1) e terceira semana (EG3) e controlo negativo (NC). O gráfico ilustra o número de linfócitos T CD4⁺ esplénicos nos diferentes grupos; CG, EG1 e EG3 em áreas de polpa branca e vermelha. * $p < 0,05$ vs CG. # $p < 0,05$ EG1 vs. EG3..**Erro! Marcador não definido.**

Figura 5 - Células T esplénicas CD8⁺. No topo, imunocoloração para expressão de CD8⁺ em linfócitos esplénicos com aumento de $\times 400$. Grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1) e terceira semana (EG3) e controlo negativo (NC). O gráfico ilustra o número de linfócitos T CD8⁺ esplénicos nos diferentes grupos; CG, EG1 e EG3 em áreas de polpa branca e vermelha. * $p < 0,05$ vs CG..... 40

Figura 6 - Razão CD4⁺/CD8⁺ das células T esplénicas. Grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1) e terceira semana (EG3). * $p < 0,05$ vs CG. # $p < 0,05$ EG1 vs. EG3.. 41

Figura 7 - Expressão de NF- κ B no baço. No topo, ensaio imunohistoquímico para ativação de NF- κ B p65 em tecidos do baço. Ampliação 400 $\times$. Grupo controlo (CG), grupo exercitado até o final da primeira semana (EG1), terceira semana (EG3) e controlo negativo (NC). O gráfico ilustra o número de células positivas em áreas da polpa branca e polpa vermelha nos diferentes grupos. * $p < 0,05$ vs CG. # $p < 0,05$ EG1 vs. EG3..... 41

RESUMO

O treinamento físico intenso em excesso pode comprometer a funcionalidade do sistema imune e contribuir para o aparecimento de sintomas associados a síndrome de sobretreino (OTS). O objetivo deste estudo foi analisar as alterações morfológicas esplênicas em ratos Wistar submetidos a treinamento exigente e com períodos de descanso curtos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos; grupo controlo (CG) e grupo exercitado (EG), posteriormente divididos em dois subgrupos, EG1, sacrificados ao fim de 1 semana de treino e EG3, sacrificados ao fim de 3 semanas de treino. Os animais foram estimulados a correr na esteira (-20º; a partir dos 25m/min, com aumento progressivo de 1,25 m/minuto a cada sessão; 1 hora/dia) 6 dias/semana. O Peso corporal, ingestão de alimentos, aparência dos pêlos, comportamento e capacidade dos animais de realizar o trabalho imposto foram avaliados durante o protocolo. O baço foi coletado para análise histológica e imuno-histoquímica para identificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e fator de transcrição NF-κB. O protocolo realizado não foi capaz de induzir a OTS, entretanto, foi observado diminuições em áreas de polpa branca em EG3 em relação aos demais grupos. O treinamento induziu uma diminuição nas células T CD4⁺ esplênicas com aumento nas células T CD8⁺. O treinamento elevou a expressão de NF-κB comparativamente aos animais sedentários. Em conclusão, mesmo não havendo manifestação de OTS, o treinamento físico extenuante com curtos períodos de descansos, altera estruturas histológicas e imunológicas do baço, sugerindo um comprometimento na funcionalidade do sistema imune.

Palavras-chave: Exercício; estresse mecânico; sistema imunológico; baço; histologia.

ABSTRACT

Excessively intense physical training can compromise the functionality of the immune system and contribute to the appearance of symptoms associated with overtraining syndrome (OTS). The aim of this study was to analyze the splenic morphological changes in Wistar rats submitted to demanding training with short rest periods. The animals were randomly assigned to 2 groups; control group (CG) and exercise group (EG), subsequently divided into two subgroups, EG1, sacrificed after 1 week of training and EG3 sacrificed after 3 weeks of training. The animals were stimulated to run on the treadmill (-20°; from 25m/min, with a progressive increase of 1.25m/minute at each session; 1 hour/day) 6 days/week. Body weight, food intake, appearance of hair, behavior and ability of animals to perform the imposed work were assessed during the protocol. The spleen was collected for histological analysis and immunohistochemical for the identification of CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T cells and NF-κB transcription factor. The protocol performed was not able to induce OTS, however, decreases were observed in areas of white pulp in EG3 in relation to the other groups. The training induced a decrease in splenic CD4⁺ T cells with an increase in CD8 + T cells. The training increased the expression of NF-κB compared to sedentary animals. In conclusion, even without manifestation of OTS, strenuous physical training with short periods of rest, alter the histological and immunological structures of the spleen, suggesting a compromise in the functionality of the immune system.

Key words: Exercise; mechanical stress; immune system; spleen, histology.

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BW	Peso corporal (body weight)
CD	Grupo de diferenciação (clusters of differentiation)
DNTs	Doenças não transmissíveis
EF	Exercício físico
FI	Ingestão de comida (food intake)
H&E	Hematoxilina-Eosina
IFN-γ	Interferona γ
IGA	Imunoglobulina A
IGG	Imunoglobulina G
IGM	Imunoglobulina M
IKB	Inibidores de κB
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
IL-5	Interleucina-5
ITRS	Infecções no trato respiratório superior
LPS	Lipossacarídeo
MHC I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
FO	Overreaching funcional
NFO	Overreaching não funcional
NK	Natural killer
OR	Overreaching
OTS	Síndrome do overtraining
PALS	Bainha linfóide periarteriolar
PB	Polpa branca
POMS	Perfil do estado de humor (Profile of Mood State)

PV	Polpa vermelha
RESTQ	Questionário de Recuperação-Estresse para Atletas
SI	Sistema imune
TC	Linfócitos T citotóxicos
TH	Linfócitos T auxiliares/helper
TH1	Linfócito T helper Tipo I
TH2	Linfócito T helper Tipo II
TLR4	Receptor toll-like 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRC	Receptor de células T
TREG	Linfócitos T reguladores
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

A inatividade física constitui um dos fatores primários para o desenvolvimento de doenças crónicas degenerativas não transmissíveis e, por isso, representa uma das principais causas de mortalidade prematura (Blair et al., 1995; Blair et al., 1989; Dohrn et al., 2018; Hallal et al., 2012). No entanto, a praticado exercício físico feito regularmente é capaz de promover inúmeros benefícios fisiológicos e funcionais ao indivíduo, implicando na promoção da saúde e na expectativa de sua vida (Vina et al., 2012).

De fato, o exercício físico praticado regularmente tem a capacidade de alterar a composição e funcionalidade de vários sistemas orgânicos, inclusive do sistema imune, estando estas alterações fenotípicas, favoráveis ou desfavoráveis, dependentes das características do estímulo recebido (Matthews et al., 2002; Meyer et al., 2001; Shephard & Shek, 1994). O modelo “J curve” (Nieman, 1994) foi proposto para descrever as alterações ocorridas após o treino físico com característica aeróbica, onde indivíduos que praticam exercício aeróbio regularmente de intensidade moderada possuem menos riscos de obterem infecções no trato respiratório superior-ITRS como também ficam menos resfriadas em comparação com indivíduos sedentários e aqueles que praticam exercício de alta intensidade/longa duração (Nieman et al., 2011; Nieman et al., 1993). Por exemplo, alguns atletas profissionais e recreacionais são continuamente acometidos por estados deletérios causados por treinos excessivos, os quais ultrapassando a capacidade individual de adaptação fisiológica, sem os necessários períodos de descanso e recuperação adequados, contribuem para o aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam a síndrome de sobre-treino OTS, (Smith, 2000). Para que o treino físico possua efeitos orgânicos favoráveis, com melhoria de funcionalidade e tolerância ao esforço físico é imprescindível que haja períodos adequados de descanso em equilíbrio com a intensidade e duração das sessões de exercícios (Halsen & Jeukendrup, 2004).

É sabido que o exercício físico agudo, quando extenuante, cria grandes alterações homeostáticas com uma diminuição geral da função do sistema

imunológico (Gleeson, 2007; Papacosta & Gleeson, 2013), estando descrita uma diminuição essencialmente na proporção $TCD4^+ : TCD8^+$ o que pode estar associado a imunossupressão com maior suscetibilidade a infecções virais pós-exercício (Fry et al., 1992; Lin et al., 1993; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Terra et al., 2012). Em termos crónicos e com protocolos exigentes para indução de OTS, o treinamento físico pode causar a longo prazo disfunções e alterações na funcionalidade dos linfócitos T e suas subpopulações, sobretudo no perfil Th1 e Th2, refletindo possível estresse fisiológico crónico com supressão imunológica (Gholamnezhad et al., 2018; Gholamnezhad et al., 2014; Guimarães et al., 2017; Smith, 2003).

O baço é um órgão linfoide que se destaca pelas suas atribuições no sistema imunológico inato e adquirido. A sua estrutura possibilita a remoção de partículas, agentes invasores e células sanguíneas envelhecidas ou defeituosas, função esta que em conjunto com um compartimento linfoide altamente coordenado, torna-o o órgão mais importante para a reatividade imunológica antibacteriana e antifúngica (Mebius & Kraal, 2005). As repercussões do exercício físico agudo no sistema imunológico podem ser regulados, em parte, pela redistribuição sistémica das células imunológicas encontradas no baço e em outros órgãos linfoides (Adams et al., 2011; Kruger & Mooren, 2007), contribuindo para a linfocitose induzida pelo exercício físico agudo (Nielsen, 2003). Para além disso, o exercício agudo excessivo tem sido relacionado com o desenvolvimento de estruturas esplênicas anormais, acompanhadas de atrofia do órgão (Yuan et al., 2018).

Sabendo da importância da continuidade do treinamento físico seja no âmbito do alto desempenho ou de atividades realizadas por praticantes recreacionais, torna-se necessário uma análise das alterações que ocorrem no sistema imune resultantes da repetição de exercícios excessivos com recuperação insuficiente, possibilitando assim esclarecer e minimizar fatores que possam vir a contribuir para o desenvolvimento de uma OTS. Levando em consideração o papel desempenhado pelo baço como descrito anteriormente, hipotetizasse que o treinamento exaustivo com recuperações inadequadas ocasiona alterações histológicas e imunológicas precoces no baço mesmo na

ausência de OTS. O objetivo deste estudo foi o de testar esta hipótese em ratos Wistar submetidos a treino físico mecanicamente exigente, de alta intensidade e com recuperações incompletas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Analisar no tempo as implicações esplénicas em ratos Wistar submetidos ao treino físico excêntrico de alta intensidade.

1.1.2 Objetivos específicos

- Analisar as áreas de polpa branca e polpa vermelha.
- Avaliar a distribuição de células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como as células marcadas com NF-κB.

CAPÍTULO II

REVISÃO DE LITERATURA

2. Revisão da literatura

2.1 Inatividade física e exercício físico

Os níveis de inatividade física têm aumentado substancialmente em diversos países, isto tem contribuído para a prevalência de doenças não transmissíveis- DNTs, como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e seus fatores de riscos; tensão alta, açúcar no sangue e excesso de peso, afetando a saúde geral da população global (WHO, 2010). Dados apontam que 31,1% dos adultos em todo o mundo são fisicamente inativos, a não prevalência de atividade física foi identificada como o quarto principal fator de risco para a mortalidade mundial, correspondendo a cerca de 6% das morte em todo o mundo (Hallal et al., 2012; WHO, 2010).

Os efeitos benéficos na saúde causado pelo exercício físico já estão bem estabelecidos (Pedersen & Saltin, 2015). O exercício físico agudo tem a capacidade de perturbar a homeostasia orgânica, inclusive do sistema imune, que se modificará de acordo com o estímulo recebido (Shephard & Shek, 1994). Para que se tenha melhora da capacidade de manter a homeostasia é necessário que o organismo se adapte, essa adaptação refere-se a uma alteração na estrutura e na função de uma célula ou sistema orgânico diante de situações de estresse, para que ocorra a adaptação é necessário a exposição prolongada de um estresse específico (Powers & Howley, 2017).

O excesso de treinamento por longos períodos também causa prejuízos a saúde, cargas extenuantes de estresse físico e mental podem causar efeitos deletérios no sistema imunológico (Guimarães et al., 2017). É bem visto na literatura os benefícios de sessões de altas intensidades na saúde e na performance, como por exemplo, exercícios intervalados (Asadi & Ramírez-Campillo, 2016; Swain & Franklin, 2006), no entanto, para que se tenha adaptações ideais do treinamento é necessário que se tenha um equilíbrio entre as cargas de treinamento e períodos adequados de descansos (Halsen & Jeukendrup, 2004). É importante também ter em mente as distinções e repercussões dos exercícios de caráter agudo e crônico na função imune, de maneira geral as repostas agudas são aquelas que ocorrem em associação

direta com a sessão de exercício e podem ser imediatas ou tardias, enquanto que a adaptação crônica é resultado da exposição sistemática ao estímulo do exercício (Costa Rosa & Vaisberg, 2002).

2.2 Introdução ao Sistema imunológico

De origem no latim, o termo imunidade (*immunis*) significa “isento” (Coico & Sunshine, 2019) no qual refere-se a todos os mecanismos que proporcionam proteção ao corpo contra os agentes estranhos. A imunidade resulta de um sistema que inclui um grupamento altamente complexo e coordenado, autorregulador de células, hormônios e moduladores interativos que defendem o corpo contra a invasão de microrganismos patogênicos advindos de exterior (bactérias, fungos e vírus), de macrocélulas estranhas e contra o crescimento anormal de células cancerosas. Este sistema pode ser dividido em duas atividades relacionadas: reconhecimento e resposta (Kindt et al., 2007), que confere em um reconhecimento do organismo estranho e no recrutamento de uma diversidade de células e moléculas para montar uma resposta efetiva com o objetivo de eliminar ou neutralizar o agente infeccioso. A redundância do sistema imune é promovida pelo trabalho sinérgico do sistema imune inato e sistema imune adaptativo (também conhecido como adquirido ou específico), ambos os sistemas colaboram para proteger o organismo contra invasores estranhos e garantir uma resposta imune eficiente.

2.2.1 Sistema imune inato

Este sistema confere proteção ao corpo humano contra as agressões externas e internas o que inclui componentes anatômicos e fisiológicos: Barreiras físicas, componentes celulares e proteínas do complemento (Fig. 2.1). A defesa externa é primeira linha de defesa de sistema inato composto pela pele e membranas mucosas, os componentes celulares remete aos fagócitos (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos) e linfócitos natural killer (Hall, 2017; Powers & Howley, 2017). O sistema complemento descreve o sistema de cerca de 20 proteínas que são produzidas principalmente pelo fígado e são

encontradas em altas concentrações no sangue e tecidos em sua forma inativa (Hall, 2017). A imunidade inata apresenta outras características específicas; não possui memória, sua resposta ao patógeno é rápida e não específica ao antígeno (Coico & Sunshine, 2019). Como descrito anteriormente o sistema imune inato e adquirido trabalham em sinergia, o sistema imune inato também é responsável pela deflagração na ativação do sistema imune adaptativo que, por sua vez, as células e produtos desse sistema reforçam a defesa desenvolvida pelo sistema imune inato (Delves et al., 2018).

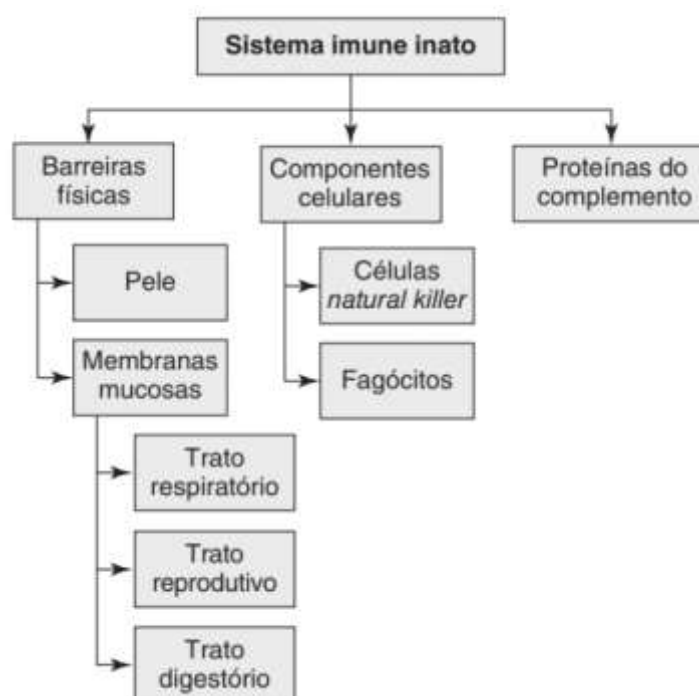


Figura 2.1. Principais componentes da imunidade inata (Powers & Howley, 2017).

2.2.3 Sistema Imune Adquirido

Diferente do inato, a resposta desse sistema leva mais tempo, geralmente 4 a 5 dias, entretanto, estas respostas são cuidadosamente adaptadas para a natureza do agente infeccioso, no qual produz receptores de antígenos para reconhecer patógenos específicos (Kindt et al., 2007). A resposta imune adaptativa é mediada principalmente por linfócitos T e B. Essas células possuem

receptores específicos em suas membranas plasmáticas, que podem ser adaptados para reconhecer uma gama quase ilimitada de estruturas, e, portanto, esse sistema tem duas características que predominam: memória e especificidade (Coico & Sunshine, 2019; Powers & Howley, 2017). Os linfócitos T devem seu nome ao timo, o local onde eles se diferenciam, podem ser divididos em três subconjuntos funcionais gerais: linfócitos T auxiliares (Th), citotóxicos (Tc) e reguladores (Treg), cujas funções consistem em auxiliar os linfócitos B a produzir anticorpos (Th), destruir as células infectadas por vírus (Tc) ou monitorar as ações de outras células (Treg), os linfócitos T são a base da resposta imunológica mediada por células e são fundamentais para a organização de muitos aspectos da resposta imune humoral (Delves et al., 2018; Ross & Pawlina, 2018).

As diferentes células do sistema imune apresentam moléculas de superfícies diferentes e exclusivas, portanto, para diferenciar e quantificar as várias populações de linfócitos é necessário detectar marcadores moleculares. A maioria das proteínas citoplasmáticas e da membrana plasmáticas do SI recebeu nomes, “moléculas CD” (*clusters of differentiation*) o qual os relacionam a proteínas (antígenos) expressas em diferentes fases da maturação celular, cada marcador molecular recebeu um número, por exemplo, linfócitos CD4-presente nos linfócitos Th, CD8-presente nos linfócitos Tc e Treg, CD19-existente nos linfócitos B (Lowe & Anderson, 2016). Uma das funções dessas moléculas incluem atuação como receptores de antígenos ou co-estimulação afim de acentuar a ativação dos linfócitos e transmitir sinais através da membrana plasmática para o interior da célula (Ross & Pawlina, 2018). Os anticorpos para as diversas moléculas CD podem ser usados para identificar subpopulações específicas de linfócitos e outras células do SI usando diferentes métodos, incluindo marcações por imuno-histoquímica (Delves et al., 2018).

Os linfócitos T CD4⁺ (auxiliares/helper-th0) são restritos ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II que fixa ao TRC anteriormente “apresentados” as APC (Kindt et al., 2007), que podem se diferenciar em diversos subtipos, em que se destacam th1, que sintetizam IL-2, IFN- γ e TNF- α e th2 que sintetizam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Lowe & Anderson, 2016; Terra et

al., 2012). Os linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) são capazes de matar outras células-alvo que estejam infectadas com microrganismos intracelulares e células de alguns tipos de tumores que interagem com moléculas MHC I (Ross & Pawlina, 2018).

As células B estão envolvidas principalmente na produção de anticorpos, são a base da resposta imune humoral. Esses linfócitos correspondem cerca de 5 a 15% dos linfócitos do sangue, quando estimulados por um antígeno sofrem proliferação clonal e se convertem em plasmócitos que em seguida, secretam proteínas específicas chamadas imunoglobulinas, que podem ser de cinco classes; IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (Delves et al., 2018; Lowe & Anderson, 2016).

2.3 Exercício e sistema imune

Apesar do primeiro trabalho ter sido publicado em 1893 relatando alterações encontradas em células do sangue após a prática de EF (Nieman & Nehlsen-Cannarella, 1994), somente na década de 70 que houve um aumento exponencial dos trabalhos nessa área. Hoje tem sido mostrado que o funcionamento do SI resulta da interação formada pelo eixo imunoneuroendócrino, portanto, relativamente nova, a área da imunologia do exercício é definida como o estudo da influência do exercício, fatores ambientais e psicológicos sobre a função da imunológica (Mcardle et al., 2018).

As repercussões do exercício na função imune, vai depender do estímulo recebido, o que inclui volume e intensidade (Matthews et al., 2002; Meyer et al., 2001; Shephard & Shek, 1994). O conceito de que o exercício físico pode ocasionar efeitos negativos ou positivos sobre o risco de infecção existe há quase vinte anos, o modelo “J curve”- fig.2.3 (Nieman, 1994) foi proposto para descrever as alterações ocorridas após o treinamento aeróbio, indivíduos que praticam exercício aeróbio regularmente de intensidade moderada possuem menos riscos de obterem infecções no trato respiratório superior-ITRS como também ficam menos resfriadas em comparação com indivíduos sedentários e aqueles que praticam exercício de alta intensidade/longa duração (Nieman et al., 2011; Nieman et al., 1993).

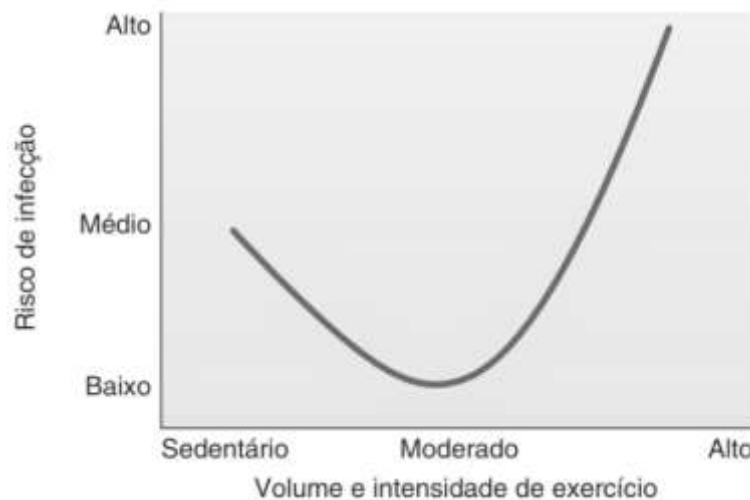


Fig.2.3 - Curva em forma de J. Esse modelo sugere que o exercício aeróbio regular quando feito de forma moderada diminui o risco de infecção, e que, exercício de alta intensidades com durações prolongadas pode aumentar esse risco (Powers & Howley, 2017).

2.3.1 Efeito do exercício agudo intenso no sistema imunológico

O exercício físico promove uma desordem fisiológica única, mesmo com as semelhanças de outras formas de estresse, especialmente pela liberação de catecolaminas na circulação, o exercício leva também ao aumento do débito cardíaco e das forças de cisalhamento vascular, circulação aprimorada do músculo em funcionamento e mudanças substanciais no pH e temperatura, todos os fatores que podem, independentemente, influenciar o tráfego e a função dos leucócitos (Adams et al., 2011).

De forma geral, o exercício físico agudo ocasiona aumento nas concentrações de leucócitos (leucocitose) na circulação durante e imediatamente após o exercício, esse modelo de recrutamento é observado nas subpopulações de leucócitos; monócitos, linfócitos (linfocitose) e neutrófilos (Dias et al., 2007; McCarthy & Dale, 1988; Pedersen & Toft, 2000; Prestes et al., 2007). O aumento dessas células no sangue está associado com aumento na concentração de catecolaminas que atuam nos receptores β 2-adrenérgicos dos

leucócitos (Canali & Kruel, 2001; Graff et al., 2018; Peake et al., 2017). No entanto, as alterações ocorridas nos leucócitos parecem não depender somente da intensidade mas também da duração do exercício (Leandro et al., 2002). Foi observado diminuições nas concentrações de neutrófilos e monócitos após uma carga aguda de exercício intenso (Pyne, 1994; Pyne et al., 2000; Woods, 2000), entretanto, esse resultado parece ter uma maior magnitude quando feito exercícios com longas durações em comparação com exercícios de alta intensidade de curta duração (Davis et al., 1997; Nieman et al., 1998; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Robson et al., 1999). Após uma carga aguda de exercício físico extenuante ocorre diminuição essencialmente na proporção $\text{TCD4}^+:\text{TCD8}^+$ o que pode estar associado a imunossupressão com maior suscetibilidade a infecções virais, enquanto que, o exercício regular moderado inibe reduções no número de células T CD4^+ ocasionando o aumento de citocinas do tipo Th1 (Fry et al., 1992; Fu et al., 2003; Gholamnezhad et al., 2018; Lin et al., 1993; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Terra et al., 2012). Em síntese, o número de células Th1 do sangue e sua capacidade de produzir IFN- γ diminuem imediatamente após uma carga de exercício exaustivo ou nos estágios iniciais da recuperação, enquanto o número de células Th2 e sua produção de IL-4 parece inalterada (Shaw et al., 2018). Os linfócitos específicos ao antígeno devem proliferar antes de se diferenciarem em células efetoras para produzir linfócitos funcionais para atividade imunogénica específica (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000), nesse sentido, foi observado diminuições nas taxas de proliferação dos linfócitos T quando feito o treinamento intensivo longo (Estruel-Amades et al., 2019). Além disso, exercícios longos e intenso (ciclismo, natação, maratona) estão associados a diminuições dos níveis nasais e salivares de IgA (Blannin et al., 1998; Leandro et al., 2002; Powers & Howley, 2017). As células NK são importantes tanto na resposta imune inata quanto na adquirida e apresentam baseado na expressão CD56 duas subpopulações: CD56^{dim} são mais citotóxicas e correspondem a 90% das células NK e $\text{CD56}^{\text{bright}}$ que correspondem a cerca de 10% das células NK circulantes, estas produzem citocinas como IFN- γ e apresentam baixa citotoxicidade (Caligiuri, 2008; Millard et al., 2013). As concentrações de células NK e a atividade citolítica dessas

células diminuem abaixo dos valores do pré-exercício em atividades extenuantes e longas, uma menor atividade dessas células é identificada de 2 a 4 horas após os exercícios (Leandro et al., 2007; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Tvede et al., 1993). Além disso, foi encontrado aumento no número de células CD56^{bright} e uma redução no número de células NK CD56^{dim} quando aumentada a carga de treinamento (Rama et al., 2013) e um favorecimento ao subgrupo CD56^{bright} durante a recuperação do estresse fisiológico (Terra et al., 2012). O exercício físico agudo pode mobilizar as células CD56^{bright} para a circulação, possivelmente dos tecidos linfoides (Caligiuri, 2008). Dentre as populações de linfócitos, as células NK apresentam evidente sensibilidade e mais responsividade ao estresse promovido pelo EF, as modulações em resposta ao exercício são dependentes da intensidade e duração do exercício (Leandro et al., 2002; Leandro et al., 2007; Terra et al., 2012). Está estabelecido que exercício longos e extenuantes resulta em aumento significativos dos níveis de cortisol, altos níveis de cortisol podem inibir a função de citocinas específicas, suprimir a função das células NK e deprimir função e produção de células T (Mcardle et al., 2018; Powers & Howley, 2017). Diante das alterações ocorridas após exercícios de longas durações, argumenta-se que essa depressão da capacidade do SI cria uma “janela aberta” Fig.2.3 em que o indivíduo fica mais susceptível a vírus e bactérias aumentando assim o risco de ITRS (Nieman, 2007). Essa teoria converge com o modelo “j curve”.

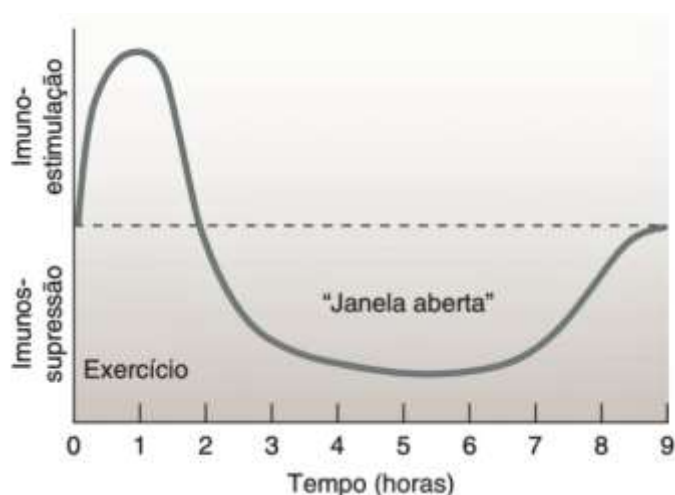


Fig. 2.3.1 “Janela aberta”- Durante esse período de disfunção imune que pode durar de 3 e 72 horas, ocasionado pelo exercício prolongado, a entrada de bactérias e vírus fica facilitada, aumentando o risco de infecção clínica e subclínica (Nieman, 2007).

Embora o exercício intenso possa afetar a função imunológica, existem outros fatores que podem contribuir com o risco aumentado de infecção em atletas envolvidos em treinamentos intensos, esses indivíduos podem se expor a outros fatores estressantes como a insônia, dieta inadequada, estresse mental, maior exposição a patógenos e imunossupressão induzida pelo exercício (Powers & Howley, 2017). Apesar desta tendência de imunidade suprimida, os atletas não podem ser considerados clinicamente imunodeficientes, uma vez que, em estado de repouso após uma série de exercícios intensos, as alterações nos números e funções circulantes de leucócitos normalmente retornam aos valores de pré-exercício dentro de algumas horas, sendo assim, no estado de repouso a função imune parece não ser diferente entre atletas e não atletas (Gleeson, 2007).

2.3.2 Efeito do exercício moderado na fase aguda e crônica

Está bem estabelecido a influência positiva de exercícios moderados em que estão associados ao aumento da função imune e a diminuição das suscetibilidades às doenças (Leandro et al., 2007; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Powers & Howley, 2017). Estudos mostram que o exercício físico a 60% $\text{VO}_{2\text{máx}}$ auxilia na quimiotaxia, desgranulação, fagocitose e atividade oxidativa dos neutrófilos uma hora após EF (Leandro et al., 2007; Suzuki et al., 2003). Scheffer et al. (2019) em seu estudo feito com modelo animal com infusão contínua de LPS mostrou que um protocolo de treinamento moderado durante três semanas impediu a exacerbação da ativação do sistema imunológico como também reservou a atividade mitocondrial no músculo esquelético. A prática regular de atividade física está associada a efeitos protetores contra o risco de cânceres (McCardle et al., 2018), o treinamento a longo prazo foi capaz de modular funções no sistema imunológico aumentando a sobrevivência de ratos portadores de tumor (Bacurau et al., 2000). A melhora da função imune não atinge somente jovens e adultos, a prática regular do exercício físico é capaz de atenuar os efeitos da imunossenescência, regulando positivamente as funções

imunológicas em idosos, diminuindo o risco de infecções e doenças autoimunes (Kohut & Senchina, 2004; Senchina & Kohut, 2007; Shimizu et al., 2008). Uma única sessão foi capaz de aumentar a atividade de células NK em indivíduos idosos (Shinkai et al., 1997), estudos a longo prazo mostrou aumento de linfócitos T CD4⁺, expressão de IL-2 (th1) e IFN- γ (th1), enquanto que as células th2 não sofreram alterações (Kohut et al., 2001; Shimizu et al., 2008), esses resultados sugerem que os idosos ficam menos susceptíveis a infecções.

2.4 NF- κ B

Descoberto em 1986, NF- κ B é um fator nuclear (NF) que interage com 11 pares de base na região promotora do gene que codifica a cadeia leve da imunoglobulina kappa de células B (KB) (Gilmore, 2006; Glezer et al., 2000). O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes que regulam a resposta inflamatória e imune (inata e adquirida), incluindo produção citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão celular e proteínas da fase aguda, processos de desenvolvimento, crescimento celular e apoptose (Caamaño & Hunter, 2002; Dolcet et al., 2005; Lawrence, 2009; Van Den Berg et al., 2001). Além disso, as evidências apontam para um papel do NF- κ B em doenças inflamatórias crônicas como artrite, asma, aterosclerose e também no cancro (Dolcet et al., 2005; Lawrence, 2009). O NF- κ B é constituído de subunidades: p65 (também chamada RelA), p50 e 52 (Dolcet et al., 2005; Lawrence, 2009). Quando não estimulado, o NF- κ B encontra-se inativo no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I κ B que impede a translocação do NF- κ B para o núcleo (Tak & Firestein, 2001). A ativação do NF- κ B deve-se por diversos estímulos extracelulares, neles estão: neurotransmissores, neurotrofinas, citocinas (IL-1, IL-2; IL-8, IL-12; IL-17; IL-18, TNF), endotoxinas (LPS), agentes carcinógenos, agentes quimioterapêuticos, irradiação ultravioleta, estresse (Caamaño & Hunter, 2002; Glezer et al., 2000; O'Neill & Kaltschmidt, 1997). Se tratando do EF o fator NF- κ B foi identificado como um potencial regulador da inflamação causado pelo exercício (Bakkar & Guttridge, 2010; Mourkioti & Rosenthal, 2008; Vella et al., 2011), vias de sinalização como NF- κ B desempenham um papel na adaptação imune mediada por exercício

(Chen et al., 2016). O exercício moderado gerou atividades anti-inflamatórias suprimindo TLR4 e fosforilação de NF-κB em esplenócitos de ratos (Chen et al., 2016).

2.5. Síndrome do Overtraining

2.5.1. Definição

Na literatura podemos encontrar várias nomenclaturas para designar o mesmo fenómeno, inclui "Burnout (esgotamento), staleness, failure adaptation (adaptação à falha), underrecovery (sub-recuperação), training stress syndrome (síndrome do estresse do treinamento), e chronic fatigue (fadiga crônica)(Kreher & Schwartz, 2012). Nesta revisão usaremos o termo comumente utilizado; síndrome do overtraining (OTS).

De acordo com a declaração de consenso conjunto do colégio europeu de ciências do esporte e do colégio americano de medicina esportiva:

Síndrome do overtraining (OTS)

É uma condição extrema de mal adaptação fisiológica a uma condição muito específica (Kreher, 2016), resultante do acúmulo de treinamento sem o descanso adequado, com diminuição da capacidade de desempenho a *longo prazo* (> 2 meses), com sinais e sintomas mais graves e fisiologia inadequada dos sistemas psicológicos, endocrinológico, neurológico e imunológico (R. Meeusen et al., 2013).

Overreaching

O OR é frequentemente usado durante um ciclo de treinamento típico para melhorar o desempenho, com descanso e recuperação apropriados, um efeito de "*supercompensação*" pode ocorrer refletindo uma melhora no desempenho, para isso o atleta exibe apenas uma diminuição da capacidade de desempenho a *curto prazo*, a restauração da capacidade de desempenho pode levar de dias a semanas (Meeusen et al., 2013). Para Lehmann et al. (1993) o OR ocorre após vários dias de treinamento extenuante e está relacionado à

fadiga muscular ou periférica podendo ser definido como uma fase pré-overtraining. Este estado funcional ainda pode ser dividido em dois; Overreaching funcional (FO) e Overreaching não funcional (NFO) estes representam o equilíbrio/desequilíbrio entre sobrecarga e repouso. Um indivíduo que manifesta o OF apresenta uma diminuição temporária do desempenho devido ao aumento do treinamento, porém, seguido de descanso adequado pode levar ao aumento do desempenho por meio da supercompensação (Meeusen et al., 2013), já o NOF levará a um decréscimo no desempenho que não será retomada por várias semanas ou meses, além de apresentar diminuição na capacidade de desempenho é também acompanhada de aumento dos sintomas/distúrbios neuroendócrinos e psíquicos (Meeusen et al., 2013).

2.5.2. Sintomas

Os sintomas da OTS, são inespecíficos e podem ser sintomas de muitos estados de doença, porém, os sintomas fisiológicos e psicológicos mais comumente relatados associados a casos de overtraining clinicamente confirmados que variam de musculatura dolorida à motivação; baixo desempenho, fraqueza muscular, fadiga crônica, músculos doloridos, aumento do esforço percebido durante o exercício, motivação reduzida, distúrbios de sono, aumento da frequência cardíaca no início da manhã ou sono, distúrbios de humor, perda de apetite e infecção recorrente (Gleeson, 2002). Outros trabalhos têm classificado os sintomas associados a OTS em função da atividade; fadiga, depressão, bradicardia e perda de motivação como sintomas mais comuns em esportes de prevalência aeróbia, enquanto insônia, irritabilidade, agitação, taquicardia, hipertensão e inquietação sendo mais comuns em esportes com predominância anaeróbia (Kreher, 2016; Kreher & Schwartz, 2012).

2.5.3. Prevalência

De acordo com Meeusen et al. (2013), há uma dificuldade em fornecer dados concretos sobre a prevalência da NFOR e OTS pois não são todos os estudos que fornecem informações claras sobre o tempo de coleta de dados. Estima-se que 33% dos jogadores de basquete, 50% dos jogadores de futebol e

60% dos maratonistas tenham apresentado sinais e sintomas da síndrome (Armstrong & VanHeest, 2002). No entanto, a OTS pode acometer não somente atletas engajados em endurance, mas também indivíduos envolvidos em programas de resistência, força e velocidade que não visam atividades de competição (Rogerio et al., 2005).

2.5.4. Diagnóstico

OTS é caracterizado por uma diminuição no desempenho, juntamente com transtornos de humor, porém, é importante salientar que não existe um único teste de diagnóstico ou biomarcador para o diagnóstico de OTS (Kreher, 2016; Meeusen et al., 2013), para se ter um diagnóstico fiel, seria necessário excluir todas as doenças que possam existir ou influenciar no estado de humor e decréscimo do desempenho, portanto, identificar precocemente a OTS é difícil já que o único parâmetro fiel e universal é a diminuição no desempenho (Meeusen et al., 2013). Embora não exista unicamente um biomarcador para o diagnóstico da OTS, os atletas e praticantes devem investigar e ter um feedback da repercussão das cargas de treinamento no organismo, para isso são necessários exames de sangue ou testes fisiológicos (Kreher, 2016). Existem biomarcadores promissores que permanecem sendo estudados; marcadores de estresse oxidativo, hormonais: relação testosterona e cortisol, imunológicos, como por exemplo, proporção das células T CD4⁺/CD8⁺, expressão de células T CD4⁺ e CD45RO⁺, respostas de leucócitos a antígenos e IgA salivar (Gleeson, 2002; Kreher & Schwartz, 2012). Os teste fisiológicos com frequência cardíaca em repouso e frequência cardíaca máxima são bastantes úteis para informar o estado fisiológico do indivíduo em relação a recuperação do treino anterior, bem como um lactato máximo diminuído nos testes de desempenho parece específico para OR (Kreher, 2016; Kreher & Schwartz, 2012; Meeusen et al., 2013). Há os testes que podem ser verificados rotineiramente, questionários sobre o estado de humor (o modelo POMS e RESTQ-Sport são os mais estudados e utilizados), diário de resposta ao treinamento e uma relação franca entre treinador e atleta são exemplos de medidas práticas que podem ser adotadas (Kreher, 2016; Meeusen et al., 2013). Para além destes, o diagnóstico

do OTS é feito após uma história muito completa de sintomas, nutrição, sono, lesões e treinamento em referência à história social, incluindo casa, trabalho e uso de substâncias (Kreher & Schwartz, 2012).

2.5.5 Prevenção e tratamento

A prevenção do OTS inclui uma periodização do treinamento que possibilite alternar sessões de treinamento com o descanso adequado, além disso, manter um registro diários das cargas de treinamento, medir marcadores fisiológicos fáceis como peso, estado de hidratação, frequência cardíaca matinal, frequência cardíaca máxima, reforçar e incentivar aspectos nutricionais ideias podem ser usadas como medidas de prevenção da OTS, é também de extrema importância a comunicação clara e franca entre atleta e técnico, indagações sobre a monotonia do treino, cargas excessiva, preocupações físicas, mentais e emocionais (Kreher, 2016; Meeusen et al., 2013). O repouso e o treinamento muito leve parecem ser os únicos agentes terapêuticos efetivos no tratamento e recuperação (Kreher & Schwartz, 2012; Meeusen et al., 2013; Silva et al., 2006).

2.5.6 Th1/Th2

O parâmetro imune th1/th2 bem como as citocinas pró e anti-inflamatórias vem sendo estudado e relacionado a exercícios exaustivos e OTS (Gholamnezhad et al., 2014; Guimarães et al., 2017; Lancaster et al., 2004; Ru & Peijie, 2009). O aumento da incidência da OTS, não é exclusiva da imunossupressão, porém, um desequilíbrio no padrão imunológico, essencialmente uma supressão da imunidade celular pode aumentar a probabilidade de uma OTS (Smith, 2003). Gholamnezhad et al. (2018) investigaram o efeito de 8 semanas de treino moderado e 11 semanas de treinamento exaustivo (overtraining) com duas semanas de recuperação, o excesso de treino causou inúmeras alterações imunológicas enquanto que o treinamento moderado promoveu imunidade celular, as duas semanas de recuperação restaurou o equilíbrio Th1 /Th2 em animais com excesso de

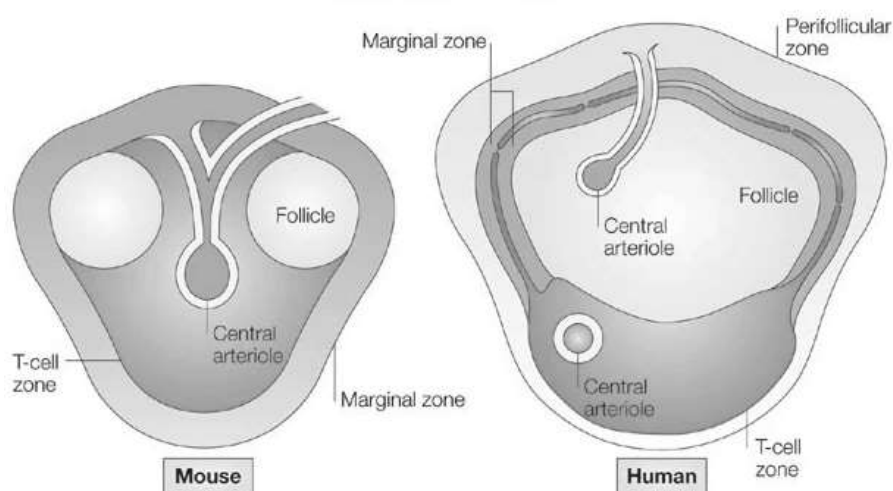
treinamento. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (Gholamnezhad et al., 2014; Guimarães et al., 2017).

Smith (2003) propõe que o desenvolvimento de linfócitos Th2 causado por trauma tecidual e sustentado por exercícios intensos resulta na supressão simultânea da imunidade mediada por células (Th1), a autora complementa que níveis aumentados de cortisol e catecolaminas e prostaglandina E2, apoiam a regulação positiva dos linfócitos Th2.

2.6 Baço e exercício físico

O baço é um órgão linfoide, que na espécie humana, é o único interposto na circulação sanguínea. Sua duas principais funções consistem em: construir uma resposta imunológica contra os antígenos transportados pelo sangue e atuar como um filtro morfológico e imunológico para remover materiais particulados e hemácias e plaquetas envelhecidas ou defeituosas, principalmente eritrócitos, da circulação (Lowe & Anderson, 2016). No feto humano ele atua como um órgão hematopoiético e essa função pode ser retomada na vida adulta como em determinadas condições patológicas (Junqueira & Carneiro, 2018). A maior parte do baço é composto pela polpa esplênica que por sua vez é dividida em duas regiões, funcional e morfológicamente diferentes: polpa branca e polpa vermelha (Lowe & Anderson, 2016). A polpa branca é uma região linfoide fortemente organizada onde respostas imunológicas adaptativas podem ser iniciadas (Mebius & Kraal, 2005). A PB é subdividida em PALS (bainha linfoide periarteriolar) e folículos linfoides cercados pela zona marginal. No tecido linfático das PALS predominam os linfócitos T, pertencentes principalmente o subgrupo TH, CD4⁺, e em menor número T CD8⁺ (Cesta, 2006), enquanto que nos folículos predominam os linfócitos B, em geral o folículos linfoides contêm centros germinativos ou folículos secundários que desenvolvem a partir da ativação das células B, a proporção de tais folículos diminuem com a idade (Junqueira & Carneiro, 2018; Lowe & Anderson, 2016). A zona marginal age como uma ponte entre a resposta imune inata e adaptativa, no qual os macrófagos nessa região apresentam APCs, reconhecendo e absorvendo eficientemente antígenos transportados elo

sangue (Lowe & Anderson, 2016; Mebius & Kraal, 2005), esta região difere anatomicamente entre primatas e roedores (Fig. 2.6). A função da polpa vermelha consiste principalmente na filtração do sangue, é formada pelos seios venosos separados por cordões esplênicos (cordões de Billroth). As evidências mais atuais apontam para a circulação aberta no baço humano, esta constitui a única via em que o sangue retorna a circulação venosa (Junqueira & Carneiro, 2018). Basicamente, após deixar a polpa branca através da artéria central e suas ramificações, o sangue entra na PV através de vasos especializados que atingem os cordões de Billroth, a partir disso os elementos figurados do sangue entram através de fendas interendoteliais presentes nos seios venosos, os elementos do sangue retornam a circulação por meio da veia esplênica, esse trajeto é caracterizado em circulação aberta (Lowe & Anderson, 2016). Em outras espécies como o rato, parte do sangue passa diretamente para os seios venosos, denominando a circulação fechada (Ross & Pawlina, 2018).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Fig. 2.6. Comparação da PB entre roedores e humanos. As principais diferenças encontram-se na zona marginal, a zona marginal do baço em humanos apresentam uma zona interna e externa seguido de uma zona perifolicular (Mebius & Kraal, 2005).

As repercussões do exercício físico no sistema imunológico podem ser regulados em parte pela redistribuição sistêmica das células imunológicas encontradas no baço e em outros órgãos linfóides (Adams et al., 2011). Foi

descoberto que a esplenectomia prejudica a linfocitose induzido pelo exercício (Nielsen et al., 1997), evidenciando que o baço e outros órgão linfoides contribuem na linfocitose induzida pelo estresse mecânico (Nielsen, 2003). Kruger & Mooren (2007) observaram que o estresse causado pelo exercício ocasionou diminuição nos linfócitos do baço acompanhado de um aumento de linfócitos no pulmão, medula óssea e placas de Peyer em ratos, resultando em uma expressão reduzida de moléculas de adesão, podendo ser resultados de uma mobilização seletiva de células para a circulação (Kruger & Mooren, 2007). As alterações nas propriedades de migração podem ser explicadas por mecanismos adrenérgicos, como as catecolaminas (Kruger & Mooren, 2007; Peake et al., 2017).

Ao que parece o exercício altamente exaustivo durante quatro semana altera as estruturas do baço, acompanhado de estruturas esplênicas anormais, como diminuição do lúmen da artéria central e atrofia dos folículos linfoides, o exercício intenso também provocou diminuição no número de centros germinativos do baço em ratos (Yuan et al., 2018). Kobayashi et al. (2014) indicaram que o exercício intenso pode aumentar a hemólise extravascular no baço e no fígado e que com o estresse repetido e exacerbado pode ocasionar anemia esportiva. Por outro lado, o exercício moderado mostrou diminuição nos marcadores inflamatórios como NF- κ B em esplenócitos de ratos (Chen et al., 2016).

CAPÍTULO III

ESTUDO EXPERIMENTAL

1. ESTUDO EXPERIMENTAL

Splenic morphologic changes induced by a strenuous and exhaustive training program in Wistar rats

Sara Maia ^{a*}, Edyla Camelo ^a, Beshoy Girgis ^a, Grace Fernanda Nunes ^a, Ana Reis-Mendes ^b, Antonio Bovolini ^a, José Alberto Duarte ^a

^a CIAFEL- Laboratory of Biochemistry and Experimental Morphology, Sports Faculty, University of Porto; Porto, Portugal.

^b UCIBIO, REQUIMTE- Laboratory of toxicology, Department of Biological Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto; Porto, Portugal.

***Corresponding author:** Sara MAIA, CIAFEL, Faculty of Sports, University of Porto, R. Dr. Plácido da Costa 91, 4200-450, Porto, Portugal.
sarahnobre96@hotmail.com

Submitted to **Biology of Sport**

ABSTRACT

Excessively intense physical training can compromise the functionality of the immune system and contribute to the appearance of symptoms associated with overtraining syndrome (OTS). The aim of this study was to analyze the splenic morphological changes in Wistar rats submitted to demanding training with short rest periods. The animals were randomly assigned to 2 groups; control group (CG) and exercise group (EG), subsequently divided into two subgroups, EG1, sacrificed after 1 week of training and EG3 sacrificed after 3 weeks of training. The animals were stimulated to run on the treadmill (-20°; from 25m/min, with a progressive increase of 1.25m/minute at each session; 1 hour/day) 6 days/week. Body weight, food intake, appearance of hair, behavior and ability of animals to perform the imposed work were assessed during the protocol. The spleen was collected for histological analysis and immunohistochemical for the identification of CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T cells and NF-κB transcription factor. The protocol performed was not able to induce OTS, however, decreases were observed in areas of white pulp in EG3 in relation to the other groups. The training induced a decrease in splenic CD4⁺ T cells with an increase in CD8⁺ T cells. The training increased the expression of NF-κB P65 compared to sedentary animals. In conclusion, even without manifestation of OTS, strenuous physical training with short periods of rest, alter the histological and immunological structures of the spleen, suggesting a compromise in the functionality of the immune system.

Key words: exercise; mechanical stress; immune system; spleen, histology.

INTRODUCTION

Physical inactivity is one of the primary factors for the development of chronic non-communicable degenerative diseases and, therefore, represents one of the main causes of premature mortality (Blair et al., 1995; Blair et al., 1989; Dohrn et al., 2018; Hallal et al., 2012). However, the practice in regular physical exercise is able to promote numerous physiological and functional benefits to the individual, implying health promotion and increasing life expectancy (Vina et al., 2012).

Indeed, physical exercise practiced regularly has the ability to change the composition and functionality of various organic systems, including the immune system, with these phenotypic changes, favorable or unfavorable, depending on the characteristics of the stimulus received (Matthews et al., 2002; Meyer et al., 2001; Shephard & Shek, 1994). The “J curve” model (Nieman, 1994) was proposed to describe the changes that occur after physical training with aerobic characteristics, where individuals who regularly practice aerobic exercise of moderate intensity have less risk of getting upper respiratory tract infection (URTI) as they also get less colds compared to sedentary individuals and those who practice high intensity/long duration exercise (Nieman et al., 2011; Nieman et al., 1993). For example, some professional and recreational athletes are continually affected by deleterious states caused by excessive training, which exceeding the individual's capacity for physiological adaptation, without the necessary adequate rest and recovery periods, contribute to the appearance of signs and symptoms that characterize the overtraining syndrome (OTS) (Smith, 2000). For physical training to have favorable organic effects, with improved functionality and tolerance to physical effort, it is essential that there are adequate rest periods in balance with the intensity and duration of the exercise sessions (Halsen & Jeukendrup, 2004).

It is well known that acute physical exercise, when strenuous, creates major homeostatic changes with a general decrease in immune system function. (Gleeson, 2007; Papacosta & Gleeson, 2013), with a decrease essentially in the TCD4⁺:TCD8⁺ ratio, which may be associated with immunosuppression with

greater susceptibility to post-exercise viral infections (Fry et al., 1992; Lin et al., 1993; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000; Terra et al., 2012). In chronic terms and with demanding protocols for OTS induction, physical training can cause dysfunctions and changes in the functionality of T lymphocytes and their subpopulations in the long term, especially in the Th1 and Th2 profile, reflecting possible chronic physiological stress with immune suppression (Gholamnezhad et al., 2018; Gholamnezhad et al., 2014; Guimarães et al., 2017; Smith, 2003).

The spleen is a lymphoid organ that stands out for its attributions in the innate and acquired immune system. Its structure makes it possible to remove particles, invading agents and aged or defective blood cells, a function that together with a highly coordinated lymphoid compartment, makes it the most important organ for antibacterial and antifungal immune reactivity (Mebius & Kraal, 2005). The repercussions of acute physical exercise on the immune system (IS) can be regulated, in part, by the systemic redistribution of immune cells found in the spleen and other lymphoid organs (Adams et al., 2011; Kruger & Mooren, 2007), contributing to acute exercise-induced lymphocytosis (Adams et al., 2011; Kruger & Mooren, 2007). In addition, excessive acute exercise has been linked to the development of abnormal splenic structures, accompanied by organ atrophy (Yuan et al., 2018).

Knowing the importance of continuing physical training, whether in the context of high performance or activities performed by recreational practitioners, it is necessary to analyze the changes that occur in the IS resulting from the repetition of excessive exercises with insufficient recovery, thus making it possible to clarify and minimize factors that may contribute to the development of an OTS. Taking into account the role played by the spleen as previously described, hypothesized that exhaustive training with inadequate recoveries causes early histological and immunological changes in the spleen even in the absence of OTS. The aim of this study was to test this hypothesis in Wistar rats submitted to mechanically demanding physical training, of high intensity and with incomplete recoveries.

METHODOLOGY

Animals and diet

Fifteen four-week-old male Wistar rats acquired from the Charles River Laboratories (Barcelona, Spain) were used. The animals remained in appropriate cages (2 per cage) with controlled temperature and humidity ($22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $60 \pm 2\%$), in an inverted 12h light/dark cycle. Throughout the experiment, all rats had access to food and water *ad libitum* (standard laboratory diet 4RF21®, Mucedola, Italy).

Composition of groups and experimental protocol

After one week of acclimatization, the animals were randomly assigned to two groups: CG = Control group, $n = 5$, with a body weight of $161.8 \pm 7.05\text{g}$ and EG = exercise group, $n = 10$, with a body weight of $164.7 \pm 16.82\text{g}$. The animals in the EG group were then randomly subdivided into two subgroups:

- EG1, $n = 5$, with a body weight $158.8 \pm 16.32\text{g}$, sacrificed at the end of the first week of protocol (for analysis of the repercussions of short-term training).
- EG3, $n = 5$, with a body weight $170.6 \pm 16.83\text{g}$, sacrificed after the end of the third week of protocol (for analysis of the repercussions of training in the medium term).

The animals were stimulated to run on the treadmill (Treadmill Control LE 8710, Harvard Apparatus, USA) 1 hour/day for 6 days per week. The training protocol consisted of 20° of negative slope with progressive increase of 1.25 meters/minute of speed in each session. The training started at a speed with 25 meters/minute ending the first week with 32.5 meters/ minutes and maximum intensity of 48 meters/minutes at end of the third week. The CG animals remained limited to the space of the cages throughout the study. The weight and amount of food consumption of the animals were evaluated daily before each training session.

Overtraining syndrome indicators

To assess the occurrence of overtraining in the exercised animals, some parameters were used: i) decrease in body weight (BW); ii) decrease in food intake (FI) (Pereira et al., 2016); iii) functional capacity to perform the physical effort determined for the training sessions (Hohl et al., 2009); iv) occurrence of aggressive behavior of animals or non-exploration in open terrain; v) appearance of hair (darkened and/or erect) and vi) occurrence of nasal bleeding (Andrade et al., 2002).

Collection of biological material

One day after the end of the protocol, the animals were weighed and anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (90mg/kg, Merial, France) with Xylazine (10mg/kg, Bayer, Germany) and then euthanized by exsanguination. The spleen was dissected and weighed using a precision scale (resolution 0.01mg; Kern 870, Balingen, Germany). To calculate the relative weight (expressed as a percentage) the organ weight was divided by the weight of the animal and multiplied by 100. The spleens were then prepared for histological analysis.

Histological analysis

Following routine laboratory procedures, the organs were sectioned into 0,5cm³ pieces, fixed in 4% formaldehyde, dehydrated with increasing concentrations of ethanol and included in paraffin to later be cut into a microtome (Leica RM 2125RT, Houston, USA) thickness of 5µm sections and mounted on silanized slides. The sections were subsequently exposed to increasing concentrations of ethanol and finally xylol, and stained with hematoxylin-eosin for study light microscopy (Axior ImagerA1, Carl Zeiss, Germany, with Leica DM4000B coupled digital camera, Nussloch, Germany).

Histomorphometric analysis of the spleen

Spleen sections were photographed with 40X objective randomly involving the entire histological section. 10 images were taken per animal, including areas of white and red pulp, to assess the areas occupied by the two pulps. In total, 150

splenic follicles were analyzed per group. The marginal zone area was obtained by subtracting the external and internal limit (follicle mantle zone) and red pulp. For this analysis, the software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, USA) was used. The white pulp area of the organ was classified according to its degree of organization according to the criteria defined in the literature. In summary, the organization of the white pulp area was classified as: well organized, with white pulp structures (germinal centers, periarteriolar sheath, marginal zone and splenic follicles) distinct, we consider this degree of organization to be of type I; moderately disorganized (type II), when the white pulp was evident, but its regions were poorly individualized or indistinct and, highly disorganized (type III) when the follicular structure was barely distinct from the red pulp and T cell areas (Santana et al., 2008). The results for the different degrees of organization of this structure were expressed in %.

Immunohistochemistry

Spleen sections were deparaffinized in xylene, rehydrated in solutions with decreasing concentrations of ethanol; and washed in PBS. Antigenic retrieval was performed in a pressure cooker for 10 min in 0.1 M citrate buffer (pH 6,0) followed by cooling to room temperature. The sections were then washed in a PBS solution and incubated to block endogenous peroxidases with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min at room temperature with subsequent washing in PBS. For blocking non-specific binding was used bovine serum albumin (BSA) 3% prepared in PBS with incubation at room temperature for 30 min. After washing in PBS, tissue sections were added rabbit polyclonal anti-CD4 antibody (diluted 1:100; ab203034, abcam), or mouse monoclonal anti-CD8 antibody (diluted 1:100; ab33786, abcam) or anti-NF- κ B polyclonal rabbit (diluted 1:100; ab16502, abcam) in PBS-T with incubation at 4°C overnight. The slides were washed with PBS before adding the secondary goat anti-rabbit antibody conjugated to IgG peroxidase (diluted 1:200; Ab97051, abcam) or rabbit anti-mouse (diluted 1:200; Ab6728, Abcam) in PBS-T for 2h at 37°C. Finally, the sections were washed, incubated with 3,3'-diaminobenzidine (SIGMAFAST™ DAB, Sigma-Aldrich) for 3 min and then counterstained with hematoxylin (1:14 dilution) for 3 min and after that for dehydration with gradual ethanol, cleaning in

xylene and assembly with DPX. Negative controls were performed for all antigens by replacing the primary antibody for PBS buffer. To obtain the images, ten regions of the spleen of each animal were uniformly selected in the upper, lower, left, right and central areas of each section of the organ per animal. Statistical analysis of positive cells stained by tissue area was performed using the interactive learning and segmentation software Ilastik version 1.3.3 (Stuart et al., 2019).

Statistical analysis

The normality of the data was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. Data with normal distribution, with results expressed as means $\pm$ standard deviation, were submitted to the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni multiple comparison test. Comparisons between groups with variables considered outside the normal distribution were performed using the Kruskal-Wallis test and Bonferroni's post-hoc tests. The data for these variables with abnormal distribution were expressed as a median with percentiles 25 and 75 (P25-P75). The χ^2 test was used to compare the degree of organization of the structures in areas of white pulp. The level of significance was set at $p < 0.05$. For all statistical procedures were used the Statistical Package for Social Sciences, version 26.0 for Windows (SPSS 26.0) and GraphPad Prism® 8.0 software program (San Diego, California, USA).

RESULTS

Body weight, food intake, and relative weight of spleen

The initial body weight of the animals did not differ between groups. There was an increase in body weight in the different groups throughout the protocol, but without significant differences ($p > 0.05$). Compared to CG, food intake suffered a significant reduction in EG1 ($p = 0.01$), but without significant differences in EG3 and ($p > 0.05$). These results are expressed in figure 1a-b.

The relative weight of the spleen (%) varied during the weeks of exercise ($p = 0.00$), with an increase in EG1 compared to the other groups ($p = 0.022$ vs.

CG and $p = 0.027$ vs. EG3). There were no significant differences in the relative weight of the spleen between CG and EG3 (Figure 1c).

In addition to these previous parameters, were not observed EG animals with the other criteria used for diagnosis of overtraining. Thus, all EG animals were able to performed the demand imposed by exercise, their hair always showed a normal, shiny and not bristly appearance, their behavior was normal, exploratory and docile, and none of them had signs of nasal bleeding during or after the procedures.

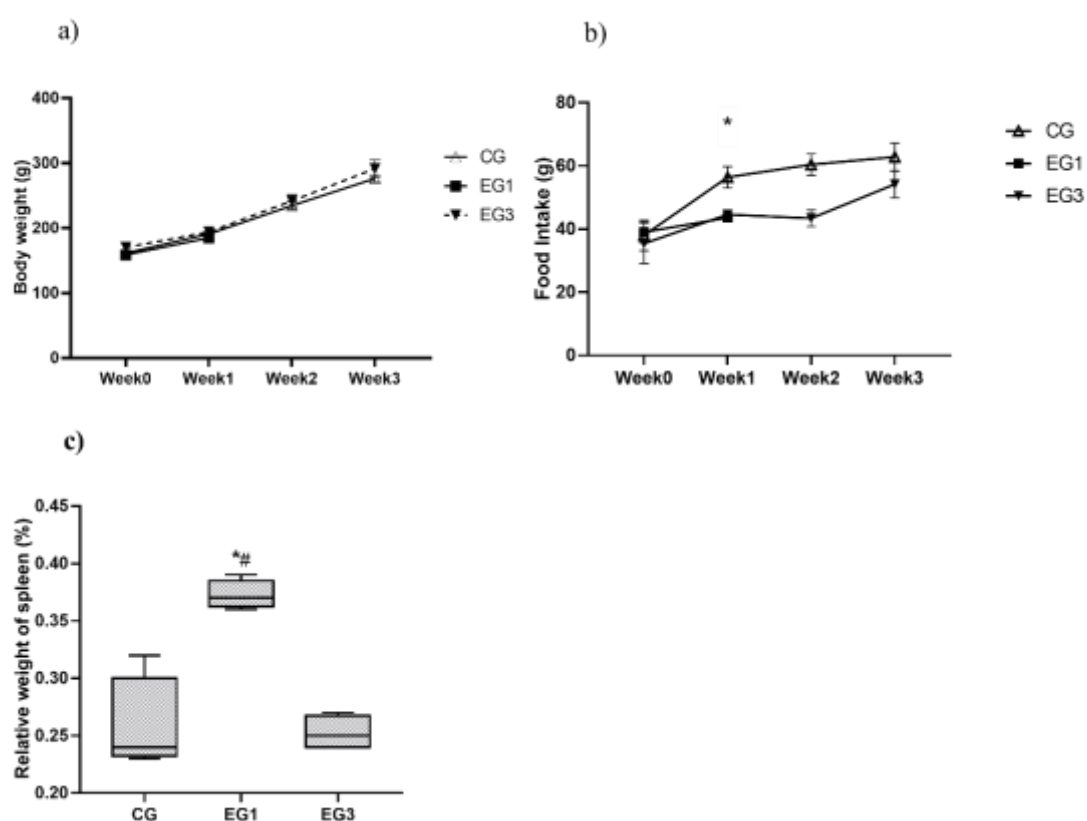


Figure 1. Indicators of body weight, food intake and relative weight of the spleen for the CG and exercised group: a) body weight during the experiment; b) food intake per animal; c) relative weight of spleen (%). * $p < 0.05$ CG vs. EG1. # $p < 0.05$ EG1 vs. EG3.

Histomorphometric analysis

The animals of EG3 showed a reduction in the area of white pulp in comparison to the CG ($p = 0.00$) specifically in the marginal zone ($p = 0.00$), having

in this structure also presented differences in relation to EG1 ($p = 0.002$). On the other hand, the lymphoid follicle did not differ between the different groups ($p=0.235$). Red pulp areas showed an increase in EG3 compared to CG ($p=0.000$). These results are shown in Figure 2a-d.

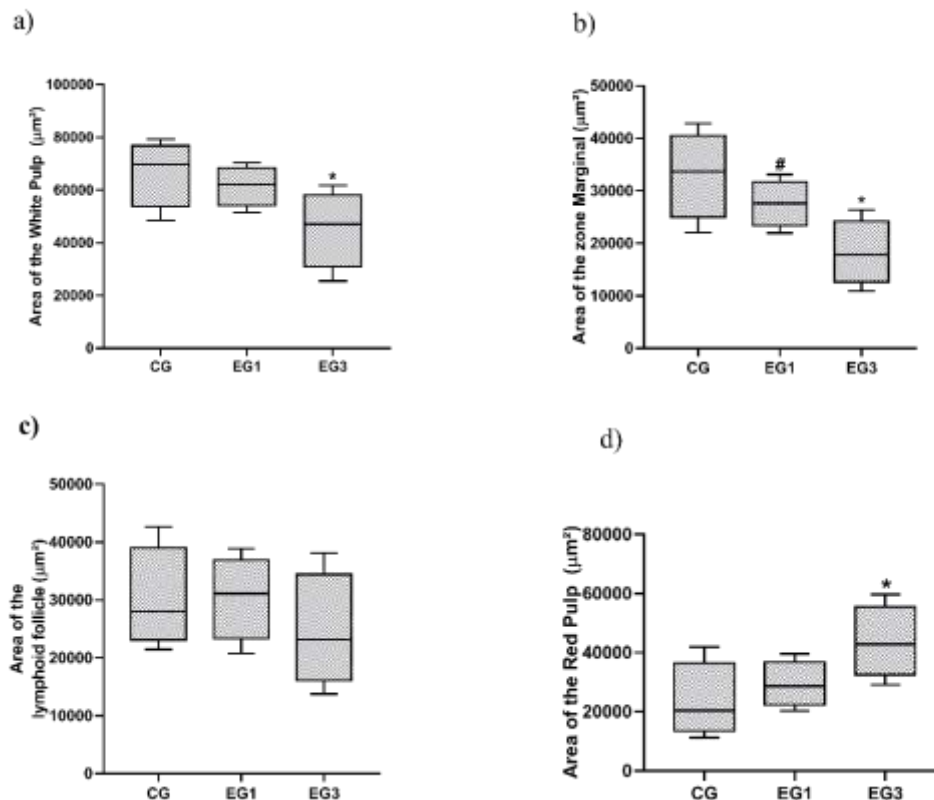


Figure 2. Splenic areas of the control group (CG), group exercised until the end of the first week (EG1) and third week (EG3). Total area of white pulp (A). Marginal zone area (B). Follicular area (C) and Total area of red pulp. * $p < 0.05$ CG vs. EG3. # $p < 0.05$ EG1 vs. EG3. Values are presented in median and percentiles (25-75).

The degree of organization of the white pulp varied between groups ($\chi^2 = 0.036$, Fig. 3). The CG showed a good percentage of well-organized structures (type I) with the presence of germinal centers, periarteriolar lymphoid sheath and splenic follicles and other well-defined structures. Compared to CG, EG1 showed a higher percentage of moderately disorganized follicular structures (CG: 20%; EG1: 50%; EG3: 60%) with evident white pulp, however, poorly delimited, in this

subgroup a large activation of plasmocytes was also observed, and higher amounts of secondary follicles, while EG3 showed highly disorganized structures in the areas of white pulp (CG: 20%; EG1: 20%; EG3: 40%) with follicular structures barely distinct from the red pulp.

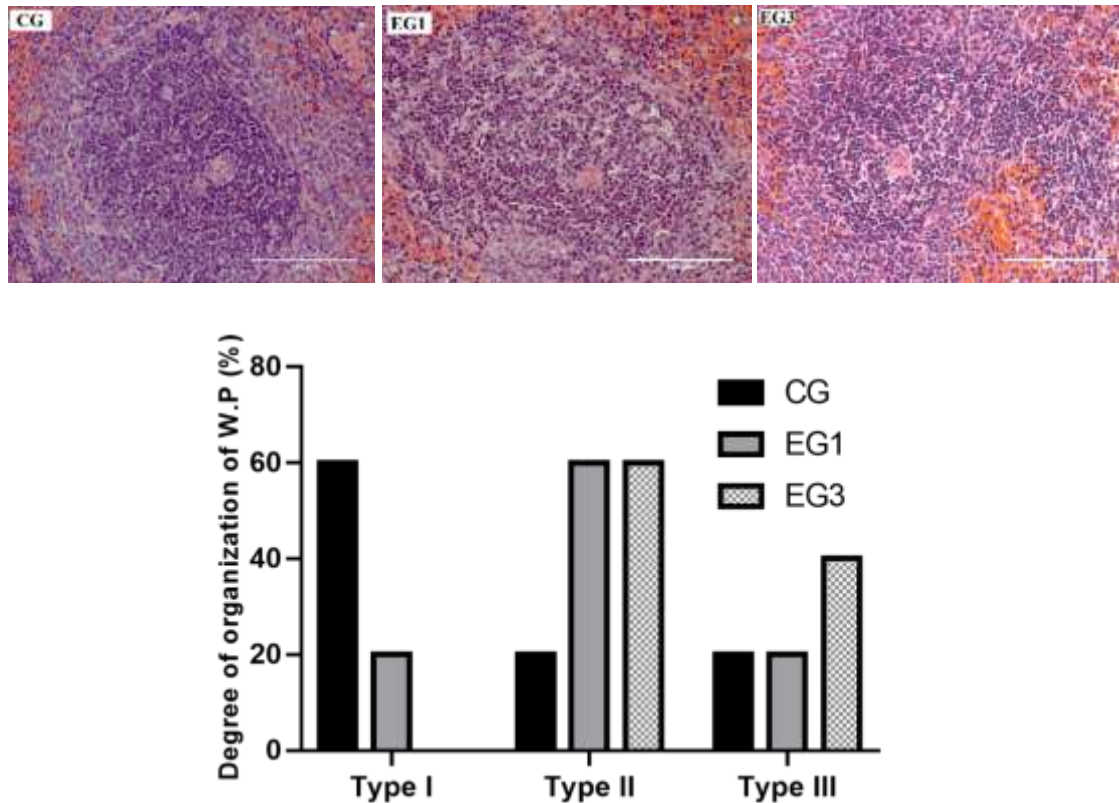


Figure 3. At the top, histological sections of the spleen. Control group (CG), group exercised until the end of the first week (EG1) and third week (EG3). Representative images of the different levels of organization of the white pulp in relation to the red pulp stained with hematoxylin eosin. Magnification 400x. The graph illustrates the relative frequencies of the different degrees of organization of the white pulp in the different groups; CG, EG1 and EG3. $*p < 0.05$.

Immunohistochemistry

CD4⁺ T lymphocytes

The results of the immunohistochemistry technique showed that CD4⁺ cells were distributed mainly in red pulp zones, with these cells increasing in EG1 and decreasing in EG3. There was an increase in these lymphocytes in a white

pulp zone in EG1 with a decrease in EG3. Statistics on the number of positive immune cells per square millimeter of tissue area analyzed showed that, compared to CG and EG1, the number of CD4⁺ cells in the EG3 subgroup decreased significantly in the red pulp zones ($p= 0.009$ vs. CG $p= 0.000$ vs. EG1) and white ($p= 0.002$ vs. CG and $p= 0.015$ vs. EG1, Figure 4).

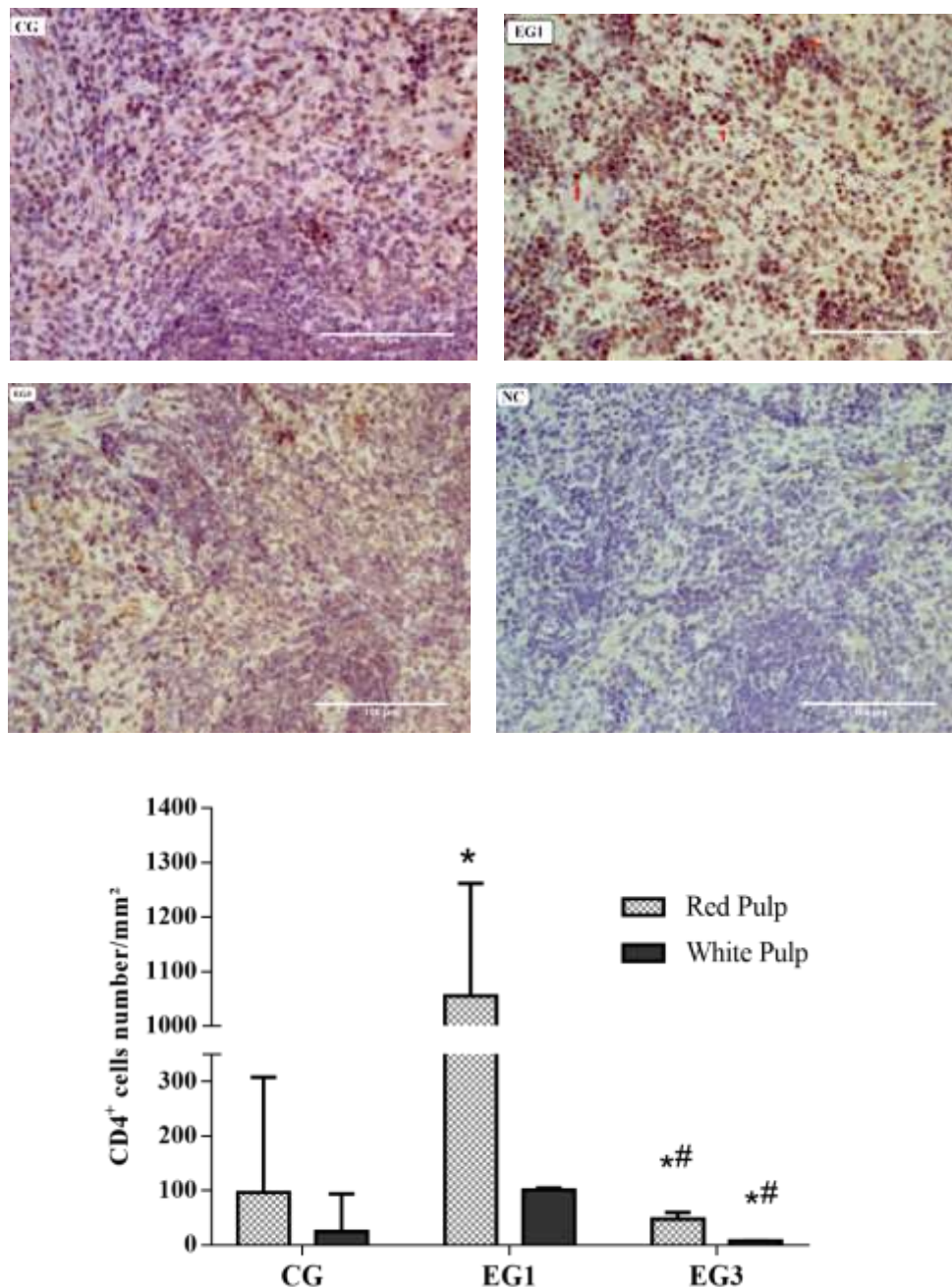
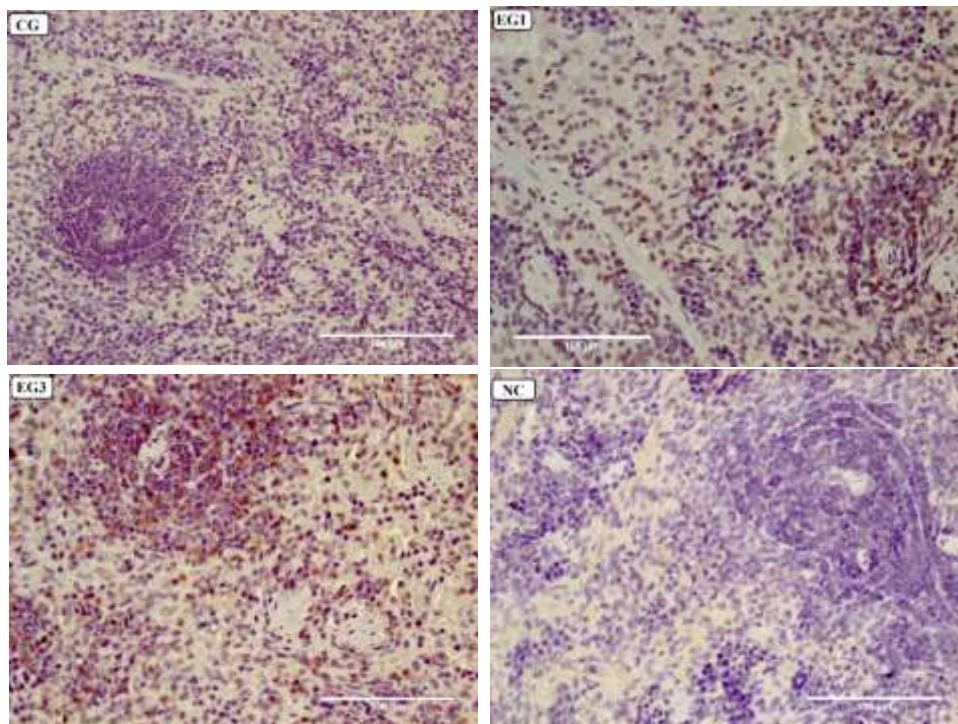


Figure 4. CD4⁺ splenic T cells. At the top, immunostaining for CD4⁺ expression in splenic lymphocytes at magnification $\times 400$. Control group (CG), group

exercised until the end of the first week (EG1) and third week (EG3) and negative control (NC). The graph illustrates the number of splenic T CD4⁺ lymphocytes in the different groups; CG, EG1 and EG3 in areas of white and red pulp. * $p < 0.05$ vs CG. # $p < 0.05$ EG1 vs. EG3.

CD8⁺ T lymphocytes

The number of cells per square millimeter of tissue area analyzed increased significantly in EG1 compared to CG in areas of white pulp ($p = 0.000$) and red pulp ($p = 0.000$). At the end of the third week (EG3) the number of CD8⁺ T lymphocytes increased compared to CG in both pulps, white and red ($p = 0.000$ and $p = 0.000$, respectively). The results are shown in figure 5. In view of the CD4⁺/CD8⁺ ratio, the EG3 subgroup showed a significant decrease in the areas of red pulp ($p = 0.000$ vs. CG, $p = 0.000$ vs. EG1) and white pulp ($p = 0.014$ vs. EG1, Figure 6).



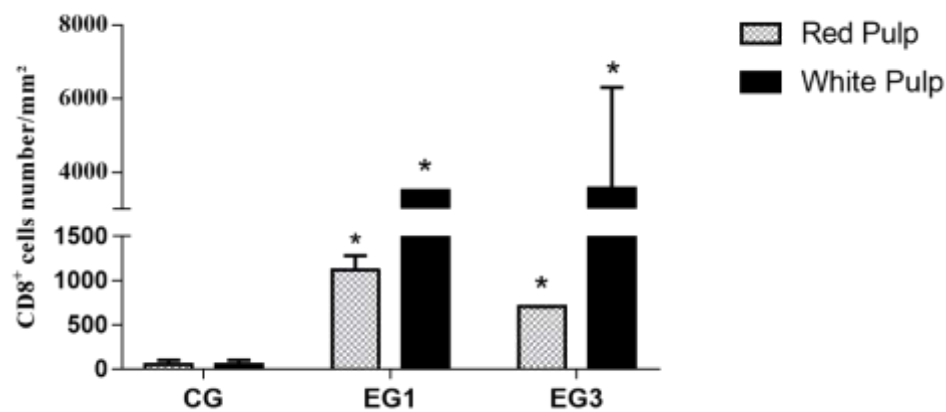


Figure 5. CD8⁺ splenic T cells. At the top, immunostaining for CD8⁺ expression in splenic lymphocytes at magnification $\times 400$. Control group (CG), group exercised until the end of the first week (EG1) and third week (EG3) and negative control (NC). The graph illustrates the number of splenic T CD8⁺ lymphocytes in the different groups; CG, EG1 and EG3 in areas of white and red pulp. * $p < 0.05$ vs CG.

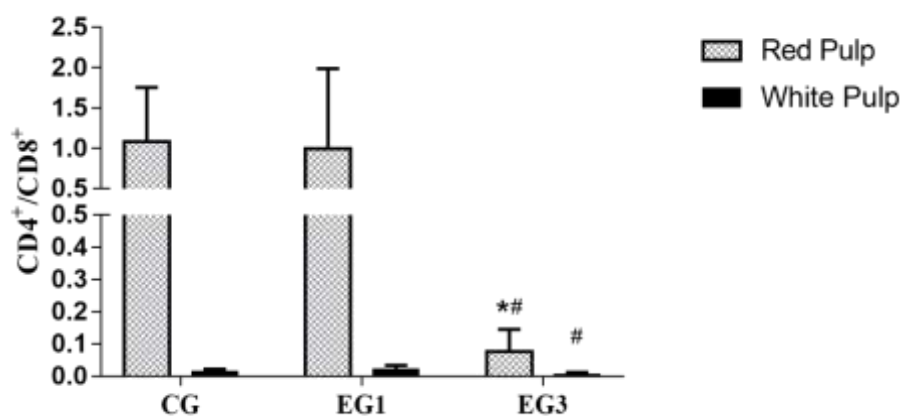


Figure 6. CD4⁺/CD8⁺ ratio splenic T cells. Control group (CG), group exercised until the end of the first week (EG1) and third week (EG3). * $p < 0.05$ vs CG. # $p < 0.05$ EG1 vs. EG3.

NF- κ B expression

Positive stains for nuclear factor kappa B p65 showed that the number of these cells increased during the protocol. There were differences in the subgroup EG3 compared to CG ($p = 0.001$) and EG1 ($p = 0.022$) in the red pulp, while in the

white pulp there were no statistical differences between the groups ($p>0.05$). The results are shown in Figure 6.

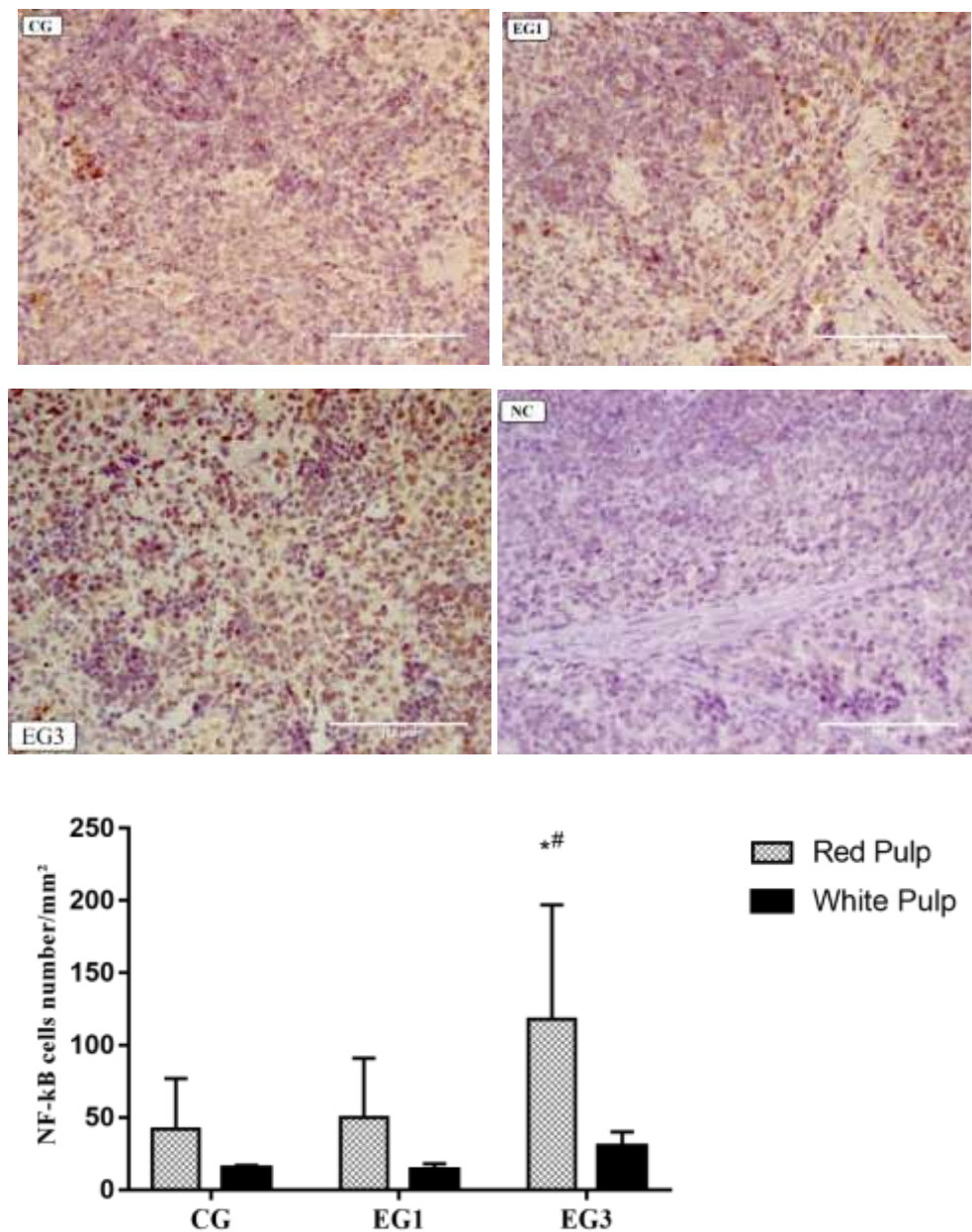


Figure 7. NF- κ B expression in the spleen. At the top, immunohistochemical assay for NF- κ B p65 activation in spleen tissues. Magnification $\times 400$. Control group (CG), group exercised until the end of the first week (EG1), third week (EG3) and negative control (NC). The graph illustrates the number of positive cells in areas of the white pulp and red pulp in different groups. * $p<0.05$ vs CG. # $p<0.05$ EG1 vs. EG3.

DISCUSSION

In the present study, the results show that high intensity eccentric training with short rest periods was not enough to induce OTS in the 3 weeks of the protocol, however, the results validate the working hypothesis, with the appearance of early structural changes in the spleen, even without the occurrence of overtraining indicators.

In fact, even with this extremely demanding training protocol demand, with a high percentage of eccentric contractions, short recovery periods and high speeds, the program was not able to induce overtraining, at least in the first 3 weeks. There were no significant differences in the animals' body weight between groups and although there was a decrease in food intake in the first week in EG1, this condition returned to normal levels at the end of the protocol (EG3). In addition, all animals from EG1 and EG3 were always able to meet the demand imposed by exercise without loss of performance, as well as showing no signs of nasal bleeding, behavioral changes or changes in the appearance of hair. As in our study, other studies have also used body weight, food intake and performance evaluation as the main diagnostic criteria for overtraining syndrome in the animal model (Hohl et al., 2009; Pereira et al., 2016; Yuan et al., 2018).

It was demonstrated that the spleen relative weight returned to values similar to the controls at the end of the protocol (EG3), after a sharp increase in EG1. This increase in the relative weight in EG1 can be explained by the lower progression of body weight increase of the exercised animals, probably caused by the decrease in food intake in conjunction with a higher caloric expenditure and proteolysis caused by the impact of the training demand (Pereira et al., 2015; Pereira et al., 2016). These results are similar to those found by Estruel-Amades et al. (2019) in which there were no differences in the relative weight of the spleen in rats submitted to intensive training for five weeks.

Our results show that, even if there are no signs or the appearance of an OTS, excessive training affects splenic structures. We found that the level of organization of the splenic area of the white pulp was different between groups, with the animals that had the most prolonged training showing a high percentage

of highly disorganized structures (type III) as well as a decrease in the area of white pulp. This level of disorganization in the white pulp can be caused by the vasoconstriction that occurs in the spleen caused by repeated acute exercise over time, which may partly explain the loss of cell populations and the impairment of cell migration to different compartments (Adams et al., 2011; Estruel-Amades et al., 2019; Peake et al., 2017), these findings being in line with those of Yuan et al. (2018) that show that excessive training induced atrophy of splenic corpuscles in mice.

Our results show that excessive eccentric training changed the lymphocyte proportions of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells. There was a proportional increase of CD4⁺ cells in the red pulp in EG1, probably due to a greater mobilization and recruitment of these cells mainly from the white pulp area to tissues and organs. There was a decrease in these cells in EG3 with an increase in CD8⁺ cells, mainly in the white pulp zone, probably caused by the activation and use of CD8⁺ cells residing in these areas. Similarly, an increase in CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in the spleen of rats has been reported after intense five-week training, however without changes in auxiliary lymphocytes (Estruel-Amades et al., 2019). The apparent discrepancies suggest that these differences in lymphocytes may vary depending on the protocol used, since in our study, we used a protocol with a high percentage of eccentric contractions and at high speeds, motivating not only greater local mechanical damage at the skeletal muscle level, but also major systemic homeostatic changes. The changes in the migration properties of spleen cells induced by training can be explained by adrenergic mechanisms, which induce a decrease in the expression of adhesion molecules, producing demargination and release of lymphocytes not only from the spleen, but also from other lymphoid organs (Kruger & Mooren, 2007; Peake et al., 2017). Increasing the number of CD8⁺ cells is likely to increase the overall function of cytotoxic T cells and to produce greater secretion of Th1 (Avula et al., 2001). Long and strenuous exercise results in significant increases in cortisol levels, and high levels of cortisol can depress T cell function and production (Mcardle et al., 2018; Powers & Howley, 2017).

Our results show that excessive eccentric training modified the lymphocyte proportions of CD4⁺ T cells/CD8⁺ T cells in the spleen. A possible explanation for the reduction in the CD4⁺/CD8⁺ ratio was due to the increase in CD8⁺ T cells in the spleen due to the decrease in the proportion of CD4⁺ cells. These data are partially confirmed by other studies in which the ratio of these lymphocytes decreased after a season of intense training (Baj et al., 1994; Bury et al., 1998). We attribute part of these cell losses to an apoptosis in the lymphocytes in the spleen. Studies have shown that exhaustive exercise increases apoptosis in splenocytes (Ferry et al., 1990; Hoffman-Goetz et al., 1999).

It is well established that the transcription factor NF-κB acts as a central regulator of stress signaling pathways and has been identified as a potential regulator of inflammation caused by exercise (Bakkar & Guttridge, 2010; Mourkioti & Rosenthal, 2008; Vella et al., 2011). Signaling pathways like NF-κB play a role in exercise-mediated immune adaptation (Chen et al., 2016). Intensive training in the present study enhanced the expression of NF-κB p65 compared to sedentary rats. Effects similar to these have been described in another work (Huang & Fang, 2019). Chen et al. (2016) suggested that the reduced expression of NF-κB in splenocytes, even after 7 days of moderate training, play a role in exercise-mediated immune adaptation, contributing to the negative regulation of NF-κB expression, suppressing the inflammatory response (Chen et al., 2016).

Due to the various results presented here, the changes occurred represent changes induced by excessive training in the spleen's immune homeostasis. Even though there was no loss of functional capacity or any other symptoms associated with OTS, an impairment in the functionality of the immune system is suggested in EG3, which may contribute to the onset of this syndrome, caused by intense exercise in excess, often repeated over time.

CONCLUSIONS

High-intensity physical training, with a high percentage of eccentric contractions and with short rests, for 3 weeks in Wistar rats, did not induce signs indicating OTS, however, this training had an impact on the acquired immune system, as evidenced by the histological changes of the spleen. In particular,

training induced a decrease in splenic CD4⁺ T cells with an increase in CD8⁺ T cells and NF-κB. It also changed the areas of white pulp and the degree of organization of these structures. Even though there may be no clinical manifestations of overtraining, coaches and athletes need to be aware of the changes that occur early in the immune system, which may be associated with immunosuppression caused by excessive intense exercise. Due to the fact that OTS did not appear, which is a limitation in this study, more research is needed using longer physical training aiming at a better understanding about intense physical exercise and immunological repercussions.

REFERENCES

- Adams, G. R., Zaldivar, F. P., Nance, D. M., Kodesh, E., Radom-Aizik, S., & Cooper, D. M. (2011). Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(4), 658-666.
- Andrade, A., Pinto, S., & Oliveira, R. S. (2002). *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro.
- Avula, C. P. R., Muthukumar, A. R., Zaman, K., McCarter, R., & Fernandes, G. (2001). Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *Journal of Applied Physiology*, 91(6), 2546-2552.
- Baj, Z., Kantorski, J., Majewska, E., Zeman, K., Pokoca, L., Fornalczyk, E., Tchórzewski, H., Sulowska, Z., & Lewicki, R. (1994). Immunological Status of Competitive Cyclists Before and After the Training Season. *Int J Sports Med*, 15(06), 319-324.
- Bakkar, N., & Guttridge, D. C. (2010). NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev*, 90(2), 495-511.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., 3rd, Barlow, C. E., Paffenbarger, R. S., Jr., Gibbons, L. W., & Macera, C. A. (1995). Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *Jama*, 273(14), 1093-1098.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., 3rd, Paffenbarger, R. S., Jr., Clark, D. G., Cooper, K. H., & Gibbons, L. W. (1989). Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *Jama*, 262(17), 2395-2401.
- Bury, T., Marechal, R., Mahieu, P., & Pirnay, F. (1998). Immunological Status of Competitive Football Players During the Training Season. *Int J Sports Med*, 19(05), 364-368.
- Chen, C.-W., Chen, C.-C., Jian, C.-Y., Lin, P.-H., Chou, J.-C., Teng, H.-S., Hu, S., Lieu, F.-K., Wang, P. S., & Wang, S.-W. (2016). Attenuation of exercise effect on inflammatory responses via novel role of TLR4/PI3K/Akt signaling in rat splenocytes. *Journal of Applied Physiology*, 121(4), 870-877.
- Dohrn, I.-M., Kwak, L., Oja, P., Sjöström, M., & Hagströmer, M. (2018). Replacing sedentary time with physical activity: a 15-year follow-up of mortality in a national cohort. *Clinical epidemiology*, 10, 179-186.
- Estruel-Amades, S., Ruiz-Iglesias, P., Pérez, M., Franch, À., Pérez-Cano, F. J., Camps-Bossacoma, M., & Castell, M. (2019). Changes in Lymphocyte Composition and Functionality After Intensive Training and Exhausting Exercise in Rats. *Frontiers in physiology*, 10, 1491-1491.
- Ferry, A., Weill, B. L., & Rieu, M. (1990). Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 69(5), 1912-1915.
- Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P., & Keast, D. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 64(3), 218-227.

- Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., & Hosseini, M. (2018). Effect of different loads of treadmill exercise on Th1/Th2 cytokine balance in rat splenocytes. *Journal of Applied Biomedicine*, 16(4), 362-369.
- Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., Hosseini, M., Sankian, M., & Khajavi Rad, A. (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(1), 1-8.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(2), 693-699.
- Guimarães, T. T., Terra, R., & Dutra, P. M. L. (2017). Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: Th1 and Th2 profile %J Motricidade. 13, 69-78.
- Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R., Haskell, W., & Ekelund, U. (2012). Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*, 380(9838), 247-257.
- Halson, S. L., & Jeukendrup, A. E. (2004). Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med*, 34(14), 967-981.
- Hoffman-Goetz, L., Zajchowski, S., & Aldred, A. (1999). Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. *Life sciences*, 64(3), 191-200.
- Hohl, R., Ferraresso, R. L. P., De Oliveira, R. B., Lucco, R., Brenzikofer, R., & De Macedo, D. V. (2009). Development and characterization of an overtraining animal model. *Medicine and science in sports and exercise*, 41(5), 1155-1163.
- Huang, X., & Fang, N. (2019). Effects of Over Swimming Training on Immune Regulation Mechanism in Mice. *Revista Científica FVC LUZ*, 29(6), 1605-1615.
- Kruger, K., & Mooren, F. C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13, 37-54.
- Lin, Y. S., Jan, M. S., & Chen, H. I. (1993). The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. *Int J Sports Med*, 14(2), 86-92.
- Matthews, C. E., Ockene, I. S., Freedson, P. S., Rosal, M. C., Merriam, P. A., & Hebert, J. R. (2002). Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc*, 34(8), 1242-1248.
- Mcardle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. (2018). *Fisiologia do exercício: Nutrição, energia e desempenho humano* (8 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 606-616.
- Meyer, T., Gabriel, H. H., Ratz, M., Muller, H. J., & Kindermann, W. (2001). Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 549-555.
- Mourkioti, F., & Rosenthal, N. (2008). NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 86(7), 747-759.
- Nieman, D. C. (1994). Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc*, 26(2), 128-139.

- Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D., & Sha, W. (2011). Upper respiratory tract infection is reduced in physically fit and active adults. *British Journal of Sports Medicine*, 45(12), 987.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Gusewitch, G., Warren, B. J., Dotson, R. C., Butterworth, D. E., & Nehlsen-Cannarella, S. L. (1993). Physical activity and immune function in elderly women. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(7), 823-831.
- Papacosta, E., & Gleeson, M. (2013). Effects of intensified training and taper on immune function %J Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. 27, 159-176.
- Peake, J. M., Neubauer, O., Walsh, N. P., & Simpson, R. J. (2017). Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol* (1985), 122(5), 1077-1087.
- Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80(3), 1055-1081.
- Pereira, B. C., da Rocha, A. L., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., de Souza, C. T., Cintra, D. E., Sant'Ana, M. R., & da Silva, A. S. R. (2015). Excessive eccentric exercise leads to transitory hypothalamic inflammation, which may contribute to the low body weight gain and food intake in overtrained mice. *Neuroscience*, 311, 231-242.
- Pereira, B. C., da Rocha, A. L., Pinto, A. P., Pauli, J. R., de Souza, C. T., Cintra, D. E., Ropelle, E. R., de Freitas, E. C., Zagatto, A. M., & da Silva, A. S. R. (2016). Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. *Life Sciences*, 145, 144-151.
- Powers, S. k., & Howley, E. T. (2017). *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho* (9 ed.). Barueri, SP.: Manole.
- Santana, C. C., Vassallo, J., de Freitas, L. A. R., Oliveira, G. G. S., Pontes-de-Carvalho, L. C., & dos-Santos, W. L. C. (2008). Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite immunology*, 30(10), 515-524.
- Shephard, R. J., & Shek, P. N. (1994). Potential impact of physical activity and sport on the immune system--a brief review. *Br J Sports Med*, 28(4), 247-255.
- Smith, L. L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc*, 32(2), 317-331.
- Smith, L. L. (2003). Overtraining, Excessive Exercise, and Altered Immunity. *Sports Medicine*, 33(5), 347-364.
- Stuart, B., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J. I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F. A., & Kreshuk, A. (2019). ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods*.
- Terra, R., Silva, S. A. G. d., Pinto, V. S., & Dutra, P. M. L. (2012). Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 18(3), 208-214.
- Vella, L., Caldow, M. K., Larsen, A. E., Tassoni, D., Della Gatta, P. A., Gran, P., Russell, A. P., & Cameron-Smith, D. (2011). Resistance exercise

- increases NF- κ B activity in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(6), R667-R673.
- Vina, J., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V., & Gomez-Cabrera, M. C. (2012). Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *British Journal of Pharmacology*, 167(1), 1-12.
- Yuan, X., Xu, S., Huang, H., Liang, J., Wu, Y., Li, C., Yuan, H., Zhao, X., Lai, X., & Hou, S. (2018). Influence of excessive exercise on immunity, metabolism, and gut microbial diversity in an overtraining mice model. *Scand J Med Sci Sports*, 28(5), 1541-1551.

NOTES

Conflicts of interest. - The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding. - This study was financed by the Fundação para a Ciência e Tecnologia (UID/DTP/00617/2019)

Acknowledgements. - The authors would like to thank Mrs. Celeste Resende for technical assistance in sample preparation for histological analysis.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES GERAIS

1. CONCLUSÕES GERAIS

A análise da literatura assim como os nossos resultados fornecem suporte para as seguintes conclusões:

- A síndrome do overtraining pode acometer não somente atletas engajados em endurance, mas também indivíduos praticantes de programas recreacionais.
- O aumento da incidência da OTS, não é exclusiva da imunossupressão, porém, um desequilíbrio no padrão imunológico pode aumentar a probabilidade de uma OTS.
- Um programa de treinamento regular e moderado contribui no aumento da capacidade funcional de mecanismos imunes, bem como diminuição das suscetibilidades as doenças em indivíduos de diversas idades.
- Assim como a inatividade física, também o exercício físico excessivo praticado de forma intensa sem descansos inadequados pode ser prejudicial para a saúde.
- No nosso estudo experimental, o treinamento altamente exigente com períodos curtos de descansos e altas contrações excêntricas não foi capaz de induzir a síndrome do overtraining a curto e médio prazo.
- Contudo, esse treinamento excêntrico de alta intensidade afetou as estruturas esplênicas, reduzindo áreas de polpa branca e alterando a organização dessas estruturas, induzindo uma diminuição nas células TCD4⁺ esplênicas com aumento nas células TCD8⁺ e acentuando a expressão de NF-κB 65.

Sugere-se mais pesquisas envolvendo uma maior duração do protocolo de treinamento, bem como a inclusão de outros biomarcadores imunológicos sistêmicos, visando um melhor entendimento acerca do treino físico intenso e suas repercussões imunológicas.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS

1. REFERÊNCIAS

- Adams, G. R., Zaldivar, F. P., Nance, D. M., Kodesh, E., Radom-Aizik, S., & Cooper, D. M. (2011). Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(4), 658-666.
- Andrade, A., Pinto, S., & Oliveira, R. S. (2002). *Animais de Laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro.
- Armstrong, L. E., & VanHeest, J. L. (2002). The Unknown Mechanism of the Overtraining Syndrome. *Sports Medicine*, 32(3), 185-209.
- Asadi, A., & Ramírez-Campillo, R. (2016). Effects of cluster vs. Traditional plyometric training sets on maximal-intensity exercise performance. *Medicina* 52(1), 41-45.
- Avula, C. P. R., Muthukumar, A. R., Zaman, K., McCarter, R., & Fernandes, G. (2001). Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *Journal of Applied Physiology*, 91(6), 2546-2552.
- Bacurau, R. F. P., Belmonte, M. A., Seelaender, M. C. L., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2000). Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochemistry and Function*, 18(4), 249-258.
- Baj, Z., Kantorski, J., Majewska, E., Zeman, K., Pokoca, L., Fornalczyk, E., Tchórzewski, H., Sulowska, Z., & Lewicki, R. (1994). Immunological Status of Competitive Cyclists Before and After the Training Season. *Int J Sports Med*, 15(06), 319-324.
- Bakkar, N., & Guttridge, D. C. (2010). NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. *Physiol Rev*, 90(2), 495-511.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., 3rd, Barlow, C. E., Paffenbarger, R. S., Jr., Gibbons, L. W., & Macera, C. A. (1995). Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *Jama*, 273(14), 1093-1098.
- Blair, S. N., Kohl, H. W., 3rd, Paffenbarger, R. S., Jr., Clark, D. G., Cooper, K. H., & Gibbons, L. W. (1989). Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women. *Jama*, 262(17), 2395-2401.
- Blannin, A. K., Robson, P. J., Walsh, N. P., Clark, A. M., Glennon, L., & Gleeson, M. (1998). The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *International journal of sports medicine*, 19(8), 547-552.
- Bury, T., Marechal, R., Mahieu, P., & Pirnay, F. (1998). Immunological Status of Competitive Football Players During the Training Season. *Int J Sports Med*, 19(05), 364-368.
- Caamaño, J., & Hunter, C. A. (2002). NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 414-429.
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461-469.
- Canali, E., & Kruehl, L. F. (2001). Respostas hormonais ao exercício. *Revista Paulista De Educação Física*, 15(2), 141-153.

- Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 455-465.
- Chen, C.-W., Chen, C.-C., Jian, C.-Y., Lin, P.-H., Chou, J.-C., Teng, H.-S., Hu, S., Lieu, F.-K., Wang, P. S., & Wang, S.-W. (2016). Attenuation of exercise effect on inflammatory responses via novel role of TLR4/PI3K/Akt signaling in rat splenocytes. *Journal of Applied Physiology*, 121(4), 870-877.
- Coico, R., & Sunshine, G. (2019). *Imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Costa Rosa, L. F. P. B., & Vaisberg, M. W. (2002). Influências do exercício na resposta imune. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 8, 167-172.
- Davis, J. M., Kohut, M. L., Colbert, L. H., Jackson, D. A., Ghaffar, A., & Mayer, E. P. (1997). Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol* (1985), 83(5), 1461-1466.
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2018). *Roitt fundamentos de imunologia* (13 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Dias, R., Frollini, A., Prestes, J., Ferreira, C., Donatto, F., Verlengia, R., Palanch, A., & Cavaglieri, C. (2007). Efeito do exercício agudo de curta duração em leucócitos circulantes e linfócitos teciduais de ratos. *Revista brasileira de educação física e esporte*, 21(3), 229-243.
- Dohrn, I.-M., Kwak, L., Oja, P., Sjöström, M., & Hagströmer, M. (2018). Replacing sedentary time with physical activity: a 15-year follow-up of mortality in a national cohort. *Clinical epidemiology*, 10, 179-186.
- Dolcet, X., Llobet, D., Pallares, J., & Matias-Guiu, X. (2005). NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 446(5), 475-482.
- Estruel-Amades, S., Ruiz-Iglesias, P., Périz, M., Franch, À., Pérez-Cano, F. J., Camps-Bossacoma, M., & Castell, M. (2019). Changes in Lymphocyte Composition and Functionality After Intensive Training and Exhausting Exercise in Rats. *Frontiers in physiology*, 10, 1491-1491.
- Ferry, A., Weill, B. L., & Rieu, M. (1990). Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 69(5), 1912-1915.
- Fry, R. W., Morton, A. R., Crawford, G. P., & Keast, D. (1992). Cell numbers and in vitro responses of leucocytes and lymphocyte subpopulations following maximal exercise and interval training sessions of different intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 64(3), 218-227.
- Fu, S. C., Qin, L., Leung, C. K., Chan, B. P., & Chan, K. M. (2003). Regular moderate exercise training prevents decrease of CD4⁺ T-lymphocytes induced by a single bout of strenuous exercise in mice. *Can J Appl Physiol*, 28(3), 370-381.
- Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., & Hosseini, M. (2018). Effect of different loads of treadmill exercise on Th1/Th2 cytokine balance in rat splenocytes. *Journal of Applied Biomedicine*, 16(4), 362-369.
- Gholamnezhad, Z., Boskabady, M. H., Hosseini, M., Sankian, M., & Khajavi Rad, A. (2014). Evaluation of immune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(1), 1-8.

- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 25(51), 6680-6684.
- Gleeson, M. (2002). Biochemical and immunological markers of over-training. *Journal of sports science & medicine*, 1(2), 31-41.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(2), 693-699.
- Glezer, I., Marcourakis, T., Avellar, M. C. W., Gorenstein, C., & Scavone, C. (2000). O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. *Rev bras psiquiatr*, 22(1), 26-30.
- Graff, R. M., Kunz, H. E., Agha, N. H., Baker, F. L., Laughlin, M., Bigley, A. B., Markofski, M. M., LaVoy, E. C., Katsanis, E., Bond, R. A., Bollard, C. M., & Simpson, R. J. (2018). β (2)-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8⁺ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. *Brain Behav Immun*, 74, 143-153.
- Guimarães, T. T., Terra, R., & Dutra, P. M. L. (2017). Chronic effects of exhausting exercise and overtraining on the immune response: Th1 and Th2 profile %J Motricidade. 13, 69-78.
- Hall, J. E. (2017). *Tratado de fisiologia médica* (13 ed.). Rio de Janeiro: Elsevier
- Hallal, P. C., Andersen, L. B., Bull, F. C., Guthold, R., Haskell, W., & Ekelund, U. (2012). Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. *Lancet*, 380(9838), 247-257.
- Halsen, S. L., & Jeukendrup, A. E. (2004). Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med*, 34(14), 967-981.
- Hoffman-Goetz, L., Zajchowski, S., & Aldred, A. (1999). Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. *Life sciences*, 64(3), 191-200.
- Hohl, R., Ferraresso, R. L. P., De Oliveira, R. B., Lucco, R., Brenzikofer, R., & De Macedo, D. V. (2009). Development and characterization of an overtraining animal model. *Medicine and science in sports and exercise*, 41(5), 1155-1163.
- Huang, X., & Fang, N. (2019). Effects of Over Swimming Training on Immune Regulation Mechanism in Mice. *Revista Científica FVC LUZ*, 29(6), 1605-1615.
- Junqueira, L. C. U., & Carneiro, J. (2018). *Histologia básica: texto e atlas* (13 ed.). Rio de Janeiro.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A., & Kuby, J. (2007). *Kuby Immunology* (6 ed.). New York: W. H. Freeman.
- Kobayashi, Y., Nakatsuji, A., Aoi, W., Wada, S., Kuwahata, M., & Kido, Y. (2014). Intense exercise increases protein oxidation in spleen and liver of mice. *Nutrition and metabolic insights*, 7, 1-6.
- Kohut, M. L., Boehm, G. W., & Moynihan, J. A. (2001). Moderate exercise is associated with enhanced antigen-specific cytokine, but not IgM antibody production in aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(11), 1135-1150.
- Kohut, M. L., & Senchina, D. S. (2004). Reversing age-associated immunosenescence via exercise. *Exerc Immunol Rev*, 10, 6-41.

- Kreher, J. B. (2016). Diagnosis and prevention of overtraining syndrome: an opinion on education strategies. *Open access journal of sports medicine*, 7, 115-122.
- Kreher, J. B., & Schwartz, J. B. (2012). Overtraining syndrome: a practical guide. *Sports health*, 4(2), 128-138.
- Kruger, K., & Mooren, F. C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13, 37-54.
- Lancaster, G. I., Halson, S. L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T., & Gleeson, M. (2004). Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev*, 10, 91-106.
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651-a001651.
- Leandro, C., Nascimento, E. d., Castro, R. M. d., Duarte, J. A., & de-Castro, C. M. M. B. (2002). Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista portuguesa de ciência do desporto*, 2(5), 80-80.
- Leandro, C. G., Castro, R. M. d., Nascimento, E., Pithon-Curi, T. C., & Curi, R. (2007). Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 13, 343-348.
- Lehmann, M., Foster, C., & Keul, J. (1993). Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med Sci Sports Exerc*, 25(7), 854-862.
- Lin, Y. S., Jan, M. S., & Chen, H. I. (1993). The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. *Int J Sports Med*, 14(2), 86-92.
- Lowe, J. S., & Anderson, P. G. (2016). *Stevens & Lowe histologia humana* (4 ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Matthews, C. E., Ockene, I. S., Freedson, P. S., Rosal, M. C., Merriam, P. A., & Hebert, J. R. (2002). Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc*, 34(8), 1242-1248.
- Mcardle, W. D., Katch, F. I., & Katch, V. L. (2018). *Fisiologia do exercício: Nutrição, energia e desempenho humano* (8 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- McCarthy, D. A., & Dale, M. M. (1988). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med*, 6(6), 333-363.
- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), 606-616.
- Meeusen, Duclos, M., Foster, C., Fry, A., Gleeson, M., Nieman, D., Raglin, J., Rietjens, G., Steinacker, J., & Urhausen, A. (2013). Prevention, diagnosis, and treatment of the overtraining syndrome: joint consensus statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc*, 45(1), 186-205.
- Meeusen, R., Duclos, M., Foster, C., Fry, A., Gleeson, M., Nieman, D., Raglin, J., Rietjens, G., Steinacker, J., & Urhausen, A. (2013). Prevention, Diagnosis, and Treatment of the Overtraining Syndrome: Joint Consensus Statement of the European College of Sport Science and the American College of Sports Medicine. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 45(1).



- Meyer, T., Gabriel, H. H., Ratz, M., Muller, H. J., & Kindermann, W. (2001). Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 549-555.
- Millard, A.-L., Valli, P., Stussi, G., Mueller, N., & Seebach, J. (2013). Brief Exercise Increases Peripheral Blood NK Cell Counts without Immediate Functional Changes, but Impairs their Responses to ex vivo Stimulation. 4(125).
- Mourkioti, F., & Rosenthal, N. (2008). NF-kappaB signaling in skeletal muscle: prospects for intervention in muscle diseases. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 86(7), 747-759.
- Nielsen, H. B. (2003). Lymphocyte responses to maximal exercise: a physiological perspective. *Sports Med*, 33(11), 853-867.
- Nielsen, H. B., Secher, N. H., Kristensen, J. H., Christensen, N. J., Espersen, K., & Pedersen, B. K. (1997). Splenectomy impairs lymphocytosis during maximal exercise. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 2), R1847-1852.
- Nieman, D. C. (1994). Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc*, 26(2), 128-139.
- Nieman, D. C. (2007). Marathon Training and Immune Function. *Sports Medicine*, 37(4), 412-415.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Austin, M. D., & Sha, W. (2011). Upper respiratory tract infection is reduced in physically fit and active adults. *British Journal of Sports Medicine*, 45(12), 987.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Gusewitch, G., Warren, B. J., Dotson, R. C., Butterworth, D. E., & Nehlsen-Cannarella, S. L. (1993). Physical activity and immune function in elderly women. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(7), 823-831.
- Nieman, D. C., & Nehlsen-Cannarella, S. L. (1994). The immune response to exercise. *Semin Hematol*, 31(2), 166-179.
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Fagoaga, O. R., Henson, D. A., Utter, A., Davis, J. M., Williams, F., & Butterworth, D. E. (1998). Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *J Appl Physiol* (1985), 84(4), 1252-1259.
- O'Neill, L. A. J., & Kaltschmidt, C. (1997). NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in Neurosciences*, 20(6), 252-258.
- Papacosta, E., & Gleeson, M. (2013). Effects of intensified training and taper on immune function %J Revista Brasileira de Educação Física e Esporte. 27, 159-176.
- Peake, J. M., Neubauer, O., Walsh, N. P., & Simpson, R. J. (2017). Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol* (1985), 122(5), 1077-1087.
- Pedersen, & Hoffman-Goetz. (2000). Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiological Reviews*, 80(3), 1055-1081.
- Pedersen, B. K., & Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports*, 25 Suppl 3, 1-72.
- Pedersen, B. K., & Toft, A. D. (2000). Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British Journal of Sports Medicine*, 34(4), 246.

- Pereira, B. C., da Rocha, A. L., Pauli, J. R., Ropelle, E. R., de Souza, C. T., Cintra, D. E., Sant'Ana, M. R., & da Silva, A. S. R. (2015). Excessive eccentric exercise leads to transitory hypothalamic inflammation, which may contribute to the low body weight gain and food intake in overtrained mice. *Neuroscience*, 311, 231-242.
- Pereira, B. C., da Rocha, A. L., Pinto, A. P., Pauli, J. R., de Souza, C. T., Cintra, D. E., Ropelle, E. R., de Freitas, E. C., Zagatto, A. M., & da Silva, A. S. R. (2016). Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. *Life Sciences*, 145, 144-151.
- Powers, S. k., & Howley, E. T. (2017). *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho* (9 ed.). Barueri, SP.: Manole.
- Prestes, J., Ferreira, C. K. d. O., Frollini, A. B., Dias, R., Donatto, F. F., Guerreschi, M. G., Palanch, A. C., Perez, S. E. d. A., & Cavaglieri, C. R. (2007). Influência do exercício físico agudo realizado até a exaustão sobre o número de leucócitos, linfócitos e citocinas circulantes. *Fitness & Performance Journal*, 6(1), 32-37.
- Pyne, D. B. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*, 17(4), 245-258.
- Pyne, D. B., Smith, J. A., Baker, M. S., Telford, R. D., & Weidemann, M. J. (2000). Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 3(1), 44-54.
- Rama, L., Teixeira, A. M., Matos, A., Borges, G., Henriques, A., Gleeson, M., Pedreiro, S., Filaire, E., Alves, F., & Paiva, A. (2013). Changes in natural killer cell subpopulations over a winter training season in elite swimmers. *European Journal of Applied Physiology*, 113(4), 859-868.
- Robson, P. J., Blannin, A. K., Walsh, N. P., Castell, L. M., & Gleeson, M. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med*, 20(2), 128-135.
- Rogero, M. M., Mendes, R. R., & Tirapegui, J. (2005). Aspectos neuroendócrinos e nutricionais em atletas com overtraining %J Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia. 49, 359-368.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2018). *Histologia: texto e atlas* (7 ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Ru, W., & Peijie, C. (2009). Modulation of NKT cells and Th1/Th2 imbalance after alpha-GalCer treatment in progressive load-trained rats. *Int J Biol Sci*, 5(4), 338-343.
- Santana, C. C., Vassallo, J., de Freitas, L. A. R., Oliveira, G. G. S., Pontes-de-Carvalho, L. C., & dos-Santos, W. L. C. (2008). Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite immunology*, 30(10), 515-524.
- Scheffer, D. d. L., Ghisoni, K., Aguiar, A. S., & Latini, A. (2019). Moderate running exercise prevents excessive immune system activation. *Physiology & Behavior*, 204, 248-255.
- Senchina, D. S., & Kohut, M. L. (2007). Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging*, 2(1), 3-16.

- Shaw, D. M., Merien, F., Braakhuis, A., & Dulson, D. (2018). T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine*, 104, 136-142.
- Shephard, R. J., & Shek, P. N. (1994). Potential impact of physical activity and sport on the immune system--a brief review. *Br J Sports Med*, 28(4), 247-255.
- Shimizu, K., Kimura, F., Akimoto, T., Akama, T., Tanabe, K., Nishijima, T., Kuno, S., & Kono, I. (2008). Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev*, 14, 24-37.
- Shinkai, S., Konishi, M., & Shephard, R. J. (1997). Aging, exercise, training, and the immune system. *Exerc Immunol Rev*, 3, 68-95.
- Silva, A. S. R., Santhiago, V., & Gobatto, C. A. (2006). Compreendendo o overtraining no desporto: da definição ao tratamento %J Revista Portuguesa de Ciências do Desporto. 6, 229-238.
- Smith, L. L. (2000). Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc*, 32(2), 317-331.
- Smith, L. L. (2003). Overtraining, Excessive Exercise, and Altered Immunity. *Sports Medicine*, 33(5), 347-364.
- Stuart, B., Kutra, D., Kroeger, T., Straehle, C. N., Kausler, B. X., Haubold, C., Schiegg, M., Ales, J., Beier, T., Rudy, M., Eren, K., Cervantes, J. I., Xu, B., Beuttenmueller, F., Wolny, A., Zhang, C., Koethe, U., Hamprecht, F. A., & Kreshuk, A. (2019). ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis. *Nature Methods*.
- Suzuki, K., Nakaji, S., Yamada, M., Liu, Q., Kurakake, S., Okamura, N., Kumae, T., Umeda, T., & Sugawara, K. (2003). Impact of a competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med Sci Sports Exerc*, 35(2), 348-355.
- Swain, D. P., & Franklin, B. A. (2006). Comparison of Cardioprotective Benefits of Vigorous Versus Moderate Intensity Aerobic Exercise. *The American Journal of Cardiology*, 97(1), 141-147.
- Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of clinical investigation*, 107(1), 7-11.
- Terra, R., Silva, S. A. G. d., Pinto, V. S., & Dutra, P. M. L. (2012). Efeito do exercício no sistema imune: resposta, adaptação e sinalização celular *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 18(3), 208-214.
- Tvede, N., Kappel, M., Halkjær-Kristensen, J., Galbo, H., & Pedersen, B. K. (1993). The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *International journal of sports medicine*, 14(5), 275-282.
- Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., & Bast, A. (2001). Transcription factor NF-κB as a potential biomarker for oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 86(S1), S121-S127.
- Vella, L., Caldow, M. K., Larsen, A. E., Tassoni, D., Della Gatta, P. A., Gran, P., Russell, A. P., & Cameron-Smith, D. (2011). Resistance exercise increases NF-κB activity in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(6), R667-R673.

- Vina, J., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V., & Gomez-Cabrera, M. C. (2012). Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise. *British Journal of Pharmacology*, 167(1), 1-12.
- WHO. (2010). *World Health Organization: Global recommendations on physical activity for health*. Consult 25/05/2020, disponível em <https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/9789241599979/en/>.
- Woods, J. A. (2000). Exercise and neuroendocrine modulation of macrophage function. *International journal of sports medicine*, 21 Suppl 1, 24-30.
- Yuan, X., Xu, S., Huang, H., Liang, J., Wu, Y., Li, C., Yuan, H., Zhao, X., Lai, X., & Hou, S. (2018). Influence of excessive exercise on immunity, metabolism, and gut microbial diversity in an overtraining mice model. *Scand J Med Sci Sports*, 28(5), 1541-1551.