



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL EJERCICIO Y EL SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN LA RATA: PAPEL DE LOS CANABINOIDES**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

SALVADOR VALENCIA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. RENÉ DRUCKER COLÍN
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. JORGE MORALES MONTOR
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. OSCAR PROSPÉRO GARCÍA
Facultad de Medicina, UNAM

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DEL DR. JORGE MORALES MONTOR BAJO
SU SUPERVISIÓN, EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

Ciudad de México, Agosto de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de investigación fue dirigido por el Dr. René Drucker Colín y la redacción de esta tesis supervisada por el Dr. Jorge Morales Montor. Los apoyos económicos empleados fueron: #IN-204716 otorgado al Dr. René Drucker Colín e #IN208715 al Dr. Jorge Morales Montor, obtenidos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A su vez se utilizó el apoyo 176803 del Programa de Fondos Sectoriales CB-SEP, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgado al Dr. Jorge Morales Montor. También se recibió apoyo proveniente del fideicomiso: Bases de colaboración “Trasplantes al Cerebro”, Dr. René Drucker Colín. Finalmente Salvador Valencia Sánchez recibió una beca complementaria del Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada para completar las últimas etapas de este estudio.

Agradecimientos

Al Dr. René Drucker Colín por todo lo enseñado, dentro y fuera de lo académico. Por postrarse como una figura ejemplar en diversos aspectos de lo que nos hace humanos. Y finalmente por representar un parteaguas en el curso de mi voluntad.

Al Dr. Jorge Morales Montor, por compartir su conocimiento y enriquecer este trabajo desde el inicio. Por el gran apoyo desinteresado tras la pérdida del Dr. René Drucker y el tiempo invertido.

Al Dr. Oscar Próspero García, depositario de mi admiración por su agudo talento y su acertada crítica. Y por la no menos importante amistad brindada.

A las biólogas, Marcela Palomero Rivero y Diana Millán Aldaco, por su invaluable ayuda técnica y enseñanza, sin las cuales este trabajo no existiría.

A mi familia, a Salvador, Jessica y Guadalupe, andamio de lo que idealmente llegaré a ser, sustrato en el inicio de mi existencia, pilares de mi ser y faro de mis anhelos.

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Lista de abreviaturas	5
1 INTRODUCCIÓN	6
1.1 Actividad física	6
1.2 Ejercicio físico	6
1.2.1 Ejercicio aeróbico y anaeróbico	7
1.2.2 Ejercicio crónico y agudo	7
1.2.3 Ejercicio concéntrico, excéntrico e isométrico	8
1.3 Ejercicio y salud	8
1.4 Sistema inmunológico	9
1.4.1 Inmunidad innata	10
1.4.2 Componentes celulares de la inmunidad innata	11
1.4.2.1 <i>Neutrófilos</i>	11
1.4.2.2 <i>Fagocitos</i>	11
1.4.2.3 <i>Células dendríticas</i>	11
1.4.2.4 <i>Células NK</i>	12
1.4.2.5 <i>otros componentes celulares de la inmunidad innata</i>	12
1.4.3 Inmunidad adaptativa	12
1.4.4 Componentes celulares de la inmunidad adaptativa	13
1.4.4.1 <i>Linfocitos</i>	13
1.5 El sistema canabinérgico	15
2 ANTECEDENTES	18
2.1 Impacto del ejercicio sobre el sistema inmune	18
2.1.1 Ejercicio agudo y células de la inmunidad innata	18
2.1.1.1 <i>Macrófagos</i>	18
2.1.1.2 <i>Neutrófilos</i>	19
2.1.1.3 <i>Natural killers</i>	19
2.1.2 Ejercicio agudo y células de la inmunidad adaptativa	19
2.1.2.1 <i>Linfocitos T</i>	19
2.1.2.2 <i>Linfocitos B</i>	20
2.1.2.3 <i>Linfocitos T citotóxicos</i>	20
2.1.3 Ejercicio crónico y componentes del SI	21
2.1.3.1 <i>Macrófagos</i>	21
2.1.3.2 <i>Neutrófilos</i>	22
2.1.3.3 <i>Células NK</i>	22
2.1.3.4 <i>Linfocitos T</i>	22
2.1.3.5 <i>Linfocitos B</i>	22
2.2 El sistema canabinérgico como potencial inmunomodulador durante el ejercicio	25
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
4 HIPÓTESIS	29
5 OBJETIVO GENERAL	29

6 OBJETIVOS PARTICULARES	29
7 MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Animales	30
7.2 Protocolo de ejercitación	30
7.3 Citometría de flujo	31
7.4 Ensayos de proliferación	32
7.5 Cultivo celular	32
7.6 Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i>	32
7.7 Determinación de los niveles de corticosterona y de IgG en suero	33
7.8 Análisis de datos	34
8 RESULTADOS	35
8.1 El ejercicio crónico a intensidad moderada altera la composición de las subpoblaciones de esplenocitos	35
8.2 El ejercicio crónico modifica la expresión de los CBR en esplenocitos de animales ejercitados	38
8.3 Los niveles de inmunoglobulina G no son alterados por el ejercicio crónico	41
8.4 El ejercicio crónico aumenta la capacidad proliferativa pero no la actividad citotóxica de esplenocitos	42
8.5 Los niveles de corticosterona en plasma no son afectados por el ejercicio crónico	46
9 DISCUSIÓN	47
10 CONCLUSIONES	52
11 PERSPECTIVAS	53
12 BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO I Artículo original	
ANEXO II Revisión	

Resumen

Los efectos positivos a la salud que la práctica de ejercicio puede conferir, han sido ampliamente estudiados, muchos de estos efectos están relacionados con el impacto directo sobre el sistema inmunológico, alterando la composición de sus subpoblaciones celulares, así como su función. Sin embargo, tales cambios difieren de acuerdo al paradigma de ejercitación estudiado, dificultando su investigación y dejando en claro la imposibilidad de generalizar sus efectos, no obstante, la relación entre el sistema inmune/ejercicio crónico ha sido menos investigada, dejando un vacío en este tema. De forma clásica, la información sugiere que el ejercicio agudo a intensidad alta, merma la función inmune, contrario a la práctica de ejercicio crónico moderado, el cual la mejora. A la par de estos descubrimientos, muchos mecanismos moleculares han sido estudiados con la finalidad de explicar los efectos promovidos por la ejercitación. A la fecha, diversos sistemas afectados por la realización de actividad física y con potencial inmuno-modulador, permanecen sin ser descritos en este contexto.

El sistema canabinérgico está conformado por receptores y sus ligandos endógenos, sin embargo estos receptores también pueden ser activados por moléculas exógenas y sintéticas. Su activación juega un papel importante en la modulación de la actividad del sistema nervioso central y del sistema inmunológico. Aún más, en el sistema inmune su activación afecta la función y el fenotipo de sus células. Aunado a esto, se ha observado que cuotas agudas de ejercicio aeróbico pueden activar al sistema canabinérgico, incrementando los niveles de anandamida en sangre, molécula agonista capaz de activar a los receptores CB1 y CB2 (presentes en células del sistema inmune).

Por lo que, el propósito de este trabajo fue el de evaluar el impacto del ejercicio aeróbico, crónico y moderado sobre el sistema inmune, así como la expresión de los receptores a canabinoide en la membrana de sus componentes celulares. Este estudio determinó que nuestro modelo de ejercicio afecta particularmente a las subpoblaciones linfocíticas, disminuyendo la proporción de células CD4+, y CD45 RA+, mientras que células T $\gamma\delta$, fueron incrementadas. Interesantemente, se observó un aumento en la expresión de los receptores a canabinoide en esas mismas células, tratándose de CB1 para células CD4+ y

T $\gamma\delta$, y de CB2 para células CD45 RA+. Los ensayos de funcionalidad *in vitro* no revelaron diferencias significativas entre los grupos al comparar la cantidad de IgG en suero, resultados similares fueron arrojados por las pruebas de actividad citotóxica para células NK, no obstante, la capacidad proliferativa de esplenocitos totales en aquellos animales entrenados fue mayor.

Nuestros datos aportan nuevo conocimiento sobre el impacto directo que el ejercicio tiene sobre el sistema inmunológico y extiende la descripción de los mecanismos subyacentes que median tales efectos. En conjunto, nuestros resultados contribuyen al entendimiento de los beneficios que la realización de ejercicio, con este modelo particular, tiene sobre la salud del practicante y apoya la idea de un incremento en la eficiencia de los componentes celulares del sistema inmune.

Abstract

The effects that exercise can elicit upon the health of those who practice it have been widely studied, many of these alterations are related to direct repercussions on the immune system, changing the composition of its cellular subpopulations and its function. Nevertheless, such changes may differ from exercise paradigm to another, making them difficult to investigate and highlighting the impossibility to generalize them. Even more, the impact that chronic exercise produces on the immune system has been less investigated, leaving a hole in this topic. Classically, data suggests that acute/high intensity exercise hinders the immune function, contrary to chronic/moderate exercise, which enhances it. Along with these findings, several molecular mechanisms have been track down in order to explain the effects that exercise causes on the immune system, and it is noteworthy that up to date, there still are systems affected by the performance of exercise with immunomodulatory potential which have not yet been described on this context.

The cannabinergic system is formed by receptors and their endogenous ligands, nevertheless, they can also bind and be activated by exogenous and synthetic molecules. Its activation plays an important role in modulating the activity at the central nervous system and the immune system. Furthermore, the activation of these receptors affects the function and phenotype of immune cells. Even more, a transient rise of anandamide (a cannabinergic agonist for CB1 and CB2 receptors) has been reported in blood during acute bouts of aerobic exercise.

Altogether, the purpose of this work was to evaluate the impact of chronic/moderate exercise on the immune system, as well as the cannabinoid receptors expression on the membrane of its cellular subpopulations. Our results showed an impact particularly in the lymphocyte subpopulations, finding CD4⁺ and CD45 RA⁺ cells decreased in those animals trained, while T γ δ cells increased in the same group of animals. Interestingly, those same cellular subpopulations showed an increase in the expression of cannabinoid receptors at their membrane, CB1 in CD4⁺ and T γ δ cells, while the amount CB2 was increased in CD45 RA⁺ cells. The functional assays did not reveal any variation in total IgG levels. Similarly, the cytotoxic activity of NK cells showed no difference among the experimental

groups, nonetheless, the proliferative capability of total splenocytes increased in trained rats.

Our results further support the notion that exercise affects the immune system and extends the description of underlying mechanisms mediating such effects. Besides, this data supports the hypothesis of a more efficient immune system in those organisms that performed exercise regularly.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANA	Anandamida
ATP	Trifosfato de adenosina
BCR	Receptor de linfocitos B
CB	Receptor a canabinoides
CBR	Receptores a canabinoides
CBS	Sistema canabinérgico
CR	Grupo experimental: control de rueda
EJER	Grupo experimental: Ejercitado
IA	Inmunidad adaptativa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
II	Inmunidad innata
IL	Interleucina
LPS	Lipolisacárido
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NK	Célula Natural killer
PCr	Fosfocreatina
PHA	Fitohemaglutinina
PMA	Forbol miristato acetato
RNA	Ácido ribonucleico
SED	Grupo experimental: sedentario
SI	Sistema inmunológico
SNC	Sistema nervioso central
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF	Factor de crecimiento transformante
THC	Tetrahidrocannabinol
VO₂ Max	Volumen de oxígeno máximo
OD	Densidad óptica

“La habilidad de impactar nuestro ambiente depende de nuestro potencial para la actividad física. El movimiento representa más que una simple conveniencia; es fundamental para el desarrollo evolutivo de los seres humanos – no menos importante que las complejidades del intelecto y la emoción.”

Katch et al., 2011

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Actividad física

La actividad física no sólo cobra valor a nivel individual, pues ésta se encuentra intrínsecamente relacionada con el desarrollo de la humanidad en un gran espectro de sus actividades. Sin embargo, la dependencia hacia ella ha de variar de acuerdo con un contexto temporal. Por ejemplo, hoy en día nuestros hábitos han cambiado y la satisfacción de nuestras necesidades básicas depende en menor grado del esfuerzo físico, repercutiendo negativamente en la salud como consecuencia del sedentarismo ¹. Para lidiar con esta situación convertida en un grave problema de nuestra época, diversas estrategias han sido desarrolladas y ninguna parece ser más eficiente que la realización de ejercicio regularmente.

1.2 Ejercicio físico

El término hace referencia a cualquier actividad estructurada y planeada que lleva a un incremento en el gasto energético y el ritmo cardíaco; éste se practica con la finalidad de mantener o mejorar la condición física, la salud y el bienestar ². El ejercicio puede ser clasificado dependiendo de factores como: la intensidad (aeróbico y anaeróbico), contracción muscular (isométrica, concéntrica y excéntrica) y frecuencia con que se practique (aguda y crónica) ³.

1.2.1 Ejercicio aeróbico y anaeróbico

El ejercicio puede ser catalogado como aeróbico o anaeróbico, cuya diferencia principal radica en las fuentes para la obtención de energía. Por un lado, el ejercicio aeróbico hace referencia a las reacciones catabólicas para generar energía, durante las cuales el oxígeno funciona como aceptador final de electrones en la cadena respiratoria, además de combinarse con dos hidrógenos para formar agua ⁴. Durante este proceso existe una baja formación de ácido láctico ³. Por otro lado, el ejercicio anaeróbico está caracterizado por no usar oxígeno y resulta en la alta acumulación de ácido láctico en la sangre, produciendo una menor cantidad de moléculas de trifosfato de adenosina (ATP) en un periodo de tiempo mas corto ⁴.

Estos dos sistemas de obtención de energía varían su contribución durante una cuota de ejercicio dependiendo de la intensidad y duración del mismo. Una máxima explosión de esfuerzo requiere una transferencia energética inmediata. Esto ocurre anaeróbicamente, casi exclusivamente mediante el uso de moléculas altamente energéticas de reserva intramusculares (trifosfato de adenosina, ATP y fosfocreatina, PCr). En actividades que se prolongan hasta 90 segundos, las reacciones anaeróbicas siguen predominando, dando lugar al inicio de la glicólisis con la subsecuente formación de lactato. A medida que la intensidad del ejercicio disminuye y la duración del mismo aumenta (~4 minutos), el ejercicio se va convirtiendo progresivamente más dependiente del metabolismo aeróbico ⁴.

1.2.2 Ejercicio crónico y agudo

El ejercicio también puede clasificarse en crónico y agudo. El ejercicio agudo se realiza por una única sesión, lo cual produce respuestas temporales metabólicas y cardiovasculares, las cuales pueden durar desde algunos minutos hasta varias horas. Por otro lado, el ejercicio crónico es aquel que se realiza de forma repetida induciendo una respuesta de entrenamiento, en donde las adaptaciones fisiológicas y metabólicas se hacen más visibles y duraderas. Tanto el ejercicio aeróbico como el anaeróbico pueden ser realizados en estas dos modalidades ⁵.

1.2.3 Ejercicio concéntrico, excéntrico e isométrico

La contracción muscular comienza cuando el sistema nervioso periférico libera acetilcolina en la unión neuro-muscular, lo que, dado que haya suficiente energía y calcio disponible, provocará que dichas fibras generen tensión. Esta acción puede provocar tres acciones diferentes en de la fibra: acortarse, alargarse o mantener su longitud. Concéntrico hace referencia al acortamiento del músculo con la producción de fuerza. La contracción excéntrica hace referencia al alargamiento del músculo desde una posición concéntrica o estática mientras existe tensión. Por último, el ejercicio isométrico consiste en la contracción muscular llevada a cabo sin el movimiento de las articulaciones afectadas ³.

1.3 Ejercicio y salud

El efecto positivo del ejercicio sobre la salud es un tema popularmente propagado, sus beneficios y papel central como alivio a diversos males es un común argumento que ha pasado anecdóticamente a través de generaciones. Su impacto en el organismo no sólo se restringe a fortalecer músculos y el sistema cardiovascular (elementos comúnmente asociados al ejercicio), pues su ejecución también se relaciona con la modulación del estado de ánimo, el metabolismo, e incluso con la prevención en el desarrollo de enfermedades complejas como el cáncer ¹. Esta atmósfera de creencias y conocimiento empírico ha permeado en todos los estratos de la sociedad ¿pero hasta qué punto el conocimiento empírico encuentra un sustrato real y medible?

Desde hace siglos, la generación sistemática y estructurada de conocimiento en esta área ha ido en incremento, apilando información contundente de la relación ejercicio-salud. Atribuyendo mejoras puntuales, desde un benéfico balance de perfil lipídico y aumento de masa ósea (revisado en ⁶), hasta modificaciones moleculares y celulares sutiles en el organismo de deportistas ⁷. A su vez, las consecuencias de la falta de actividad física

también han sido determinadas, sugiriendo una relación con el desarrollo de enfermedades, por ejemplo:

La Organización Mundial de la Salud (2019) reconoce a la inactividad física como el cuarto factor de riesgo en lo que respecta a la mortalidad mundial. A su vez se ha calculado que la inactividad física es el principal factor asociado al desarrollo de entre el 21-25% de los cánceres de mama y colon ⁸, de un 27% de los casos de diabetes ⁹ y aproximadamente de un 30% de la carga de cardiopatía isquémica (¹⁰ y OMS, 2019). Aunado a esto, en México esta información cobra mayor valor debido a que tan solo un 44% de la población se ejercita regularmente de acuerdo con el INEGI (Módulo de Práctica Deportiva y Ejercicio Físico, MOPRADEF, 2013 a 2017)

Como se comentaba previamente, la actividad física representa una solución a estos problemas agravados en la actualidad, no sólo previniéndolos ^{11,12}, sino inclusive siendo capaz de remplazar terapias farmacológicas en síndromes y enfermedades metabólicas ya establecidas ^{6,13}.

En la actualidad las creencias acerca de los efectos positivos del ejercicio sobre la salud son respaldados por la literatura científica ^{11,14,15}. No obstante, el estudio del ejercicio *per se*, y su impacto en el organismo se ha mostrado como una tarea compleja debido a su naturaleza sistémica, involucrando múltiples mecanismos fisiológicos ^{11,16-18}.

Sin embargo el impacto del ejercicio sobre la salud no se limita a mejoras metabólicas o al incremento de masa, pues su ejecución también se encuentra asociado con la incidencia de enfermedades infecciosas ¹⁹⁻²¹, y como se comentaba previamente con enfermedades multifactoriales como el cáncer ^{8,22,23}, sugiriéndose un impacto directo sobre uno de los pilares principales en el mantenimiento de la salud, el sistema inmunológico (SI).

1.4 Sistema inmunológico

El término inmunidad, en un contexto fisiológico, denota la protección de un organismo contra la enfermedad. El conjunto de órganos, células y moléculas responsables de su

ejecución conforman al sistema inmunitario ²⁴. Este sistema es sumamente adaptable y responde a amenazas variables, como infecciones que oscilan desde aquellas de naturaleza viral, hasta otras por parásitos multicelulares complejos. A su vez, su amplia variedad de células y moléculas permiten especificidad en su acción efectora a la hora de reconocer y eliminar invasores extraños ²⁵.

Dentro de la función del SI pueden distinguirse dos acciones vinculadas: reconocimiento y respuesta. El reconocimiento por su parte otorga la capacidad de distinguir entre invasores extraños y componentes propios, además de detectar células propias alteradas, que pueden desarrollar cáncer. El reconocimiento de una potencial amenaza en contra del organismo, ya sea de moléculas extrañas o la identificación de alguna célula propia transformada, desencadena una respuesta efectora diferente para cada caso ²⁴.

Las exposiciones previas a un mismo patrón molecular, el cual es reconocido por el SI es capaz de inducir memoria, caracterizada por desencadenar una reacción más rápida y agresiva en los reconocimientos ulteriores ^{24,26}.

El SI es un sistema vasto y complejo, compuesto por distintos órganos, células y moléculas con funciones refinadas y en algunos casos traslapadas con otros sistemas. Para su estudio, el SI se subdivide de acuerdo a su composición y función en inmunidad innata (II) y adaptativa (IA) ^{27,28}.

1.4.1 Inmunidad innata

Se trata de la primera línea de defensa del organismo en contra de patógenos, ya que se vale de mecanismos celulares y moleculares activos incluso antes de que una infección se presente. Por lo tanto, es responsable de eliminar la mayoría de infecciones e incluso prevenirlas, aunque su capacidad de acción básicamente se limita a microbios y células transformadas ²⁷.

Entre sus componentes se distinguen: barreras físicas y químicas como la piel, epitelios y sustancias en ellas producidas con actividad antimicrobianas; células fagocíticas como

macrófagos, neutrófilos y linfocitos citotóxicos; complejos moleculares en la sangre, como el sistema del complemento y otros mediadores de inflamación; y por último, interleucinas, que funcionan como mensajeros entre las células del SI, ayudando en el desarrollo de su maduración, perfil inflamatorio y funciones efectoras^{26,27}.

1.4.2 Componentes celulares de la inmunidad innata

1.4.2.1. Neutrófilos: también llamados leucocitos polimorfonucleares, poseen un papel importante en las etapas tempranas de las infecciones, así como en los procesos inflamatorios iniciales²⁴. En su citoplasma se encuentran múltiples gránulos rellenos de enzimas con actividad antimicrobiana. Los neutrófilos proceden de la médula ósea y nacen a partir de una estirpe común con los fagocitos mononucleares, su duración en circulación sanguínea es de aproximadamente 6 horas y pueden migrar a los focos de infección en plazos de pocas horas posterior al inicio de la infección^{29,30}.

1.4.2.2 Fagocitos mononucleares: el subsistema monocito-macrófago está compuesto por células que pertenecen a una estirpe común cuya función principal es la fagocitosis y que ocupan un lugar central en la inmunidad innata y adaptativa. Las células de este sistema encuentran su origen en la médula ósea, circulan en la sangre y comienzan su maduración en distintos tejidos. En su primera etapa son llamados monocitos, células pequeñas y con núcleos bien definidos. Posteriormente, los monocitos migran a diversos órganos donde maduran y se convierten en macrófagos, los cuales adquieren una morfología variada tras su activación²⁴.

1.4.2.3 Células dendríticas: son importantes efectoras de la inmunidad innata, sin embargo, su función también se extiende en las respuestas de la inmunidad adaptativa. Poseen extensiones membranales largas y su función es fagocítica. Al igual que los monocitos derivan de precursores situados en la médula ósea y su distribución es amplia, pues va desde tejidos linfáticos, epitelios hasta el parénquima de diversos órganos. Tienen un papel importante en las infecciones tempranas por virus ya que destacan en el montaje de respuestas de la inmunidad adaptativa como células presentadoras de antígenos²⁴.

1.4.2.4 Células NK: son una estirpe celular relacionada con los linfocitos que reconoce las células infectadas o agredidas y responde mediante su destrucción directa y la secreción de citocinas inflamatorias. Estas células son capaces de destruir a sus objetivos sin una activación previa mediada por alguna otra célula, son fuente importante de interferón gama (INF- γ), molécula que a su vez es capaz de activar a los macrófagos para suprimir a los patógenos circundantes. Al igual que los macrófagos sus precursores provienen de la médula ósea ²⁴.

1.4.2.5 Otras componentes celulares de la inmunidad innata: Existen otros elemento celulares en esta categoría, elementos efectores en reacciones alérgicas, remodelación y respuestas inmunológicas anti-parasíticas como las células cebadas³¹ y los basófilos³². Algunos otros elementos, como la microglía, que se tratan de células especializadas con funciones similares a la de macrófagos, y que están confinadas a tejidos particulares como el sistema nervioso central ²⁴, entre otras células. Todos estos, elementos que pese a su importancia no serán abordados durante este trabajo, debido a los objetivos y la necesaria delimitación del mismo, no obstante la mención de su existencia es necesaria.

1.4.3 Inmunidad adaptativa

A diferencia de la II, la IA detecta diferencias moleculares sutiles entre los patógenos, y la magnitud de su respuesta crece con las subsecuentes exposiciones al mismo. Es debido a esta capacidad de adaptación que recibe su nombre. Por lo tanto, la IA se adapta para reconocer, eliminar y, subsecuentemente, recordar al patógeno invasor ^{25,27}.

La actividad de la IA se relaciona con el montaje de defensa posterior a la activación del II, no obstante estos dos tipos de respuesta convergen e interaccionan todo el tiempo, modulándose entre sí ²⁸. Los linfocitos T cooperadores por su lado, son capaces de orquestrar y activar a las células efectoras de la II para hacer su función mas eficiente (principalmente a través de interleucinas), mientras que macrófagos y demás células presentadoras de antígenos resultan fundamentales en el inicio de la respuesta inmune

adaptativa. Una consecuencia importante de la activación de la IA, como ya se había dicho, es la generación de memoria, por lo tanto, si el mismo patógeno ingresa al organismo en una ocasión posterior, células de memoria se establecen como el medio para montar una respuesta más agresiva y eficaz en contra de la infección ²⁴.

Los principales efectores de la IA son los linfocitos y sus productos de secreción, como los anticuerpos ²⁷. A su vez, las moléculas que al ser reconocidas fomentan la respuesta inmunitaria específica son llamadas antígenos.

Cabe destacarse que ambos tipos de inmunidad representan un sistema complementario para proteger al organismo, en el que células y moléculas interactúan de manera coordinada ²⁸. La II como se ha descrito anteriormente, es considerada la primera línea de defensa, sin embargo, microorganismos patógenos han evolucionado para ser resistentes a ella, y su eliminación requiere una capacidad de reconocimiento más fina, dando lugar a la IA. No obstante, la IA es activada y dirigida por la II y, por lo tanto, las respuestas montadas por la segunda serán dependientes de la primera ²⁸.

1.4.4 Componentes celulares de la inmunidad adaptativa

1.4.4.1 Linfocitos: se trata de células poseedoras de las características definitorias de la respuesta inmunitaria adaptativa: especificidad y memoria. Esta categoría de leucocitos a su vez se subdivide en otras categorías de acuerdo a sus funciones y su expresión de productos moleculares. Por una parte, los **linfocitos B** resaltan por ser las células productoras de anticuerpos, y al igual que los **linfocitos T** su origen se da en la médula ósea. Estos últimos al salir de la médula ósea migran al timo para madurar y son importantes moduladores de la inmunidad celular ^{24,25}. Los linfocitos están provistos de receptores con los cuales son capaces de reconocer a sus antígenos específicos, para alcanzarse esta especificidad varios mecanismos genéticos son responsables: tanto el BCR (receptor de células B por sus siglas en inglés) como el TCR (receptor de células T) están compuestos por unas cadenas invariables que dotan al receptor de su estructura principal. Sin embargo, los genes que codifican para las regiones variables, aquellas encargadas de

reconocer al antígeno, se forman por recombinación de segmentos de ADN durante la maduración de estas células (revisado en ^{26,33} con respecto a la publicación de Burnet, 1959) . Cabe mencionarse que existe cierto grado de aleatoriedad en este proceso, el cual da cabida a la gran cantidad de combinaciones genéticas, que a su vez se traduce en la vasta variedad de receptores específicos posibles.

Ambos tipos de linfocitos presentan subdivisiones dada su función y fenotipo: los subconjuntos principales de los linfocitos T son los cooperadores o helpers, los citotóxicos y los reguladores, todos ellos caracterizados por presentar un receptor $\alpha\beta$ ²⁴. También existe otra categoría que se debe considerar aparte, los denominados linfocitos $T\gamma\delta$, los cuales expresan un receptor a antígeno parecido pero con una conformación molecular diferente, y los mecanismos genéticos que dan origen a sus sitios de unión con el antígeno restringen la amplitud de su repertorio en gran medida, haciéndolos similares a los receptores de patrones moleculares de patógeno con que cuentan las células pertenecientes a la inmunidad innata ²⁴.

Por su parte los linfocitos T cooperadores resaltan por su producción de interleucinas que interaccionan con otras células, principalmente con macrófagos y linfocitos B, lo que conduce a la modulación de su función y activación. Los linfocitos T que se diferencian en **citotóxicos** poseen gránulos citoplasmáticos rellenos de moléculas con actividad destructiva contra células infectadas por virus y aquellas con potencial cancerígeno. Ambas células al diferenciarse, tanto cooperadoras como citotóxicas, expresan marcadores de activación y moléculas MHC II. A diferencia de los anteriores, los **Linfocitos T reguladores** se encargan de la supresión de la actividad proinflamatoria, es decir, en ellos radica la importante función de la contención de las respuestas inmunitarias ²⁴.

Los linfocitos B que secretan anticuerpos, también denominados células plasmáticas, contienen un citoplasma abundante y un retículo plasmático rugoso grande, lugar donde se sintetizan los anticuerpos. Además, cuentan con aparato de Golgi alrededor del núcleo, donde se terminan de formar los anticuerpos y se preparan para su secreción. Estas células se desarrollan en órganos linfáticos y en los sitios donde se llevan a cabo las respuestas

inmunitarias y suelen migrar hacia la médula ósea, en donde pueden sobrevivir por mucho tiempo ²⁴.

Como ha sido mencionado previamente, el adecuado funcionamiento del SI se encuentra estrechamente regulado por la función de otros sistemas y la liberación de sus moléculas efectoras. El objetivo de este trabajo es el de arrojar luz sobre los efectos que la práctica de ejercicio crónico ocasiona sobre este sistema, y determinar si el sistema canabinérgico (CBS) contribuye a esta adaptación como consecuencia de un efecto de entrenamiento.

A continuación, en la siguiente sección de esta tesis, se encontrará información general del CBS a manera de introducción. Posteriormente, se abarcará información sugerente de su papel inmunomodulador durante la realización de ejercicio.

1.5 El sistema canabinérgico

El descubrimiento de este sistema se deriva del aislamiento del Δ^9 -Tetrahidrocannabinol, que es el principal constituyente psicoactivo de la marihuana, descrito estructuralmente en 1964 ³⁴. El sistema canabinérgico (CBS) está conformado por ligandos endógenos y receptores cuya activación puede estar dada por agonistas naturales o sintéticos. La activación de dichos receptores juega un importante rol modulador de la función del cerebro, células del sistema inmune y demás tejidos periféricos ³⁵.

El receptor CB1 es el más abundante de los receptores acoplados a proteínas G en el cerebro del sistema nervioso de adultos ³⁶. Está localizado en múltiples estructuras del sistema nervioso, donde modula la neurotransmisión sináptica y, por lo tanto, regula efectos psicoactivos. Por su lado, el receptor CB2, descrito en 1993, ha sido descartado como generador de efectos psicoactivos y fue inicialmente encontrado en la periferia, específicamente en las células del SI ³⁶.

Los receptores a canabinoides (CBR) son receptores acoplados a proteínas “G” (GPCR). Estos son similares a la rodopsina, con siete dominios trans-membranales que están

formados por siete hélices y acoplados generalmente a proteínas Gi en su parte interna de la célula³⁷ (figura 1). El descubrimiento de que dosis sub-micromolar de drogas psico-activas canabinérgicas atenuaban la acumulación de AMP-cíclico en neuronas cultivadas y su capacidad para inhibir la actividad membranal de adenilato ciclasa, comenzaron a arrojar luz sobre los mecanismos de acción de estos receptores al ser activados³⁸. Posteriormente, la eliminación de las respuestas promovidas por las drogas canabinérgicas, a través del pre-tratamiento de neuronas o membranas celulares con toxina de pertussis, confirmó su relación con proteínas Gi/o (revisado en³⁹ y⁴⁰). A su vez, diversos trabajos han proporcionado evidencia de que su activación es capaz de mediar el flujo de Ca²⁺ y estimular fosfolipasas A y C³⁹. La estimulación de CB1 y CB2, llevan a la fosforilación y activación de p42/p44 MAPK, p38 MAPK y JNK como vías de señalización para regular factores de transcripción nuclear (revisado en³⁹). El descubrimiento de sus receptores fue seguido de la demostración de que diversos tejidos en mamíferos son capaces de producir sus agonistas endógenos, todos ellos derivados del ácido araquidónico (revisado en⁴¹). Sus ligandos más investigados han sido arachidonoyl ethanolamine (anandamida) y 2-arachidonoyl glicerol, los cuales son sintetizados a demanda en vez de ser almacenados. De esta manera, CBR y endocannabinoides, constituyen lo que usualmente es referido como el “sistema endocanabinérgico” (revisado en³⁹).

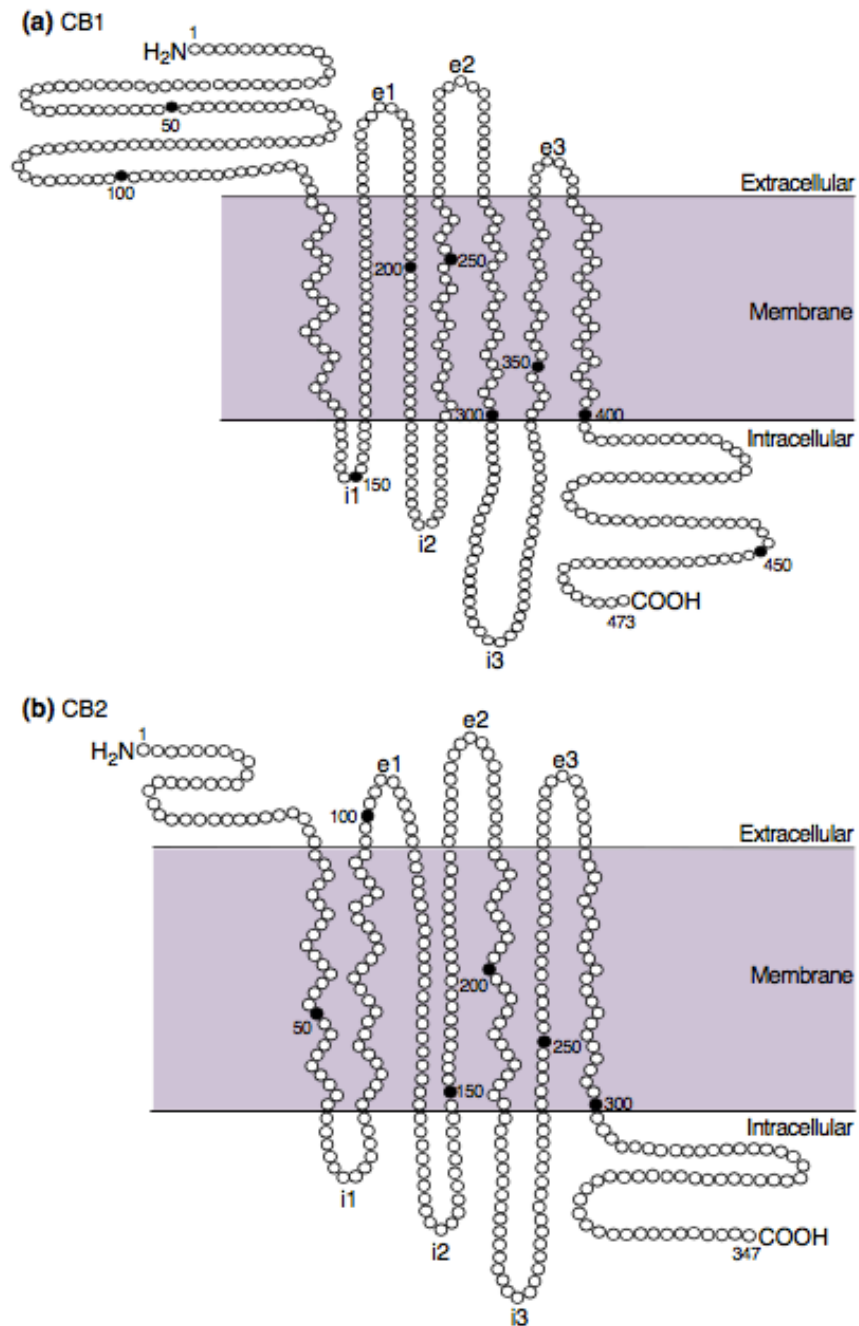


Fig. 1 Receptores a canabinoides CB1 Y CB2. Ambos receptores compuestos por una sola cadena polipeptídica con siete alfa hélices transmembranales. Además, poseen un N-terminal glicosilado en su porción extracelular y una C- terminal en su porción intracelular. Estos receptores poseen 66% de homología en su composición por aminoácidos (imagen tomada de ⁴²).

2 ANTECEDENTES

2.1 Impacto del ejercicio sobre el sistema inmune

El impacto que el ejercicio es capaz de generar en el SI ha sido ampliamente estudiado y las conclusiones de tales trabajos señalan alteraciones en su composición y función ⁴³. No obstante, la información correspondiente no sugiere que la relación ejercicio-SI sea directa. Por ejemplo, la relación entre el ejercicio y el riesgo de contraer enfermedades infecciosas en las vías respiratorias, puede ser modelada con la forma de una “J” ⁴⁴. Este modelo sugiere que el ejercicio moderado disminuye el riesgo de contraer enfermedades infecciosas en las vías respiratorias con respecto al sedentarismo, no obstante el riesgo de contraer tales infecciones se incrementa por encima del promedio durante periodos de ejercicio excesivo o de alta intensidad. ⁷ (Fig. 2). Pese a que esta visión ha prevalecido por algunas décadas, nuevas propuestas y reinterpretación de datos ofrecen un panorama fresco ⁴⁵, desacreditando el incremento de la susceptibilidad a infecciones oportunistas tras la realización de ejercicio vigoroso ^{19,46,47}, descartando variaciones moleculares como indicadores de inmunosupresión (IgA)⁴⁸ y, por último, demostrando que la dramática disminución de linfocitos después de una cuota de ejercicio, es consecuencia de una redistribución transitoria de los mismos (1-2 horas), dando lugar a un estado potenciado de inmuno-vigilancia e inmuno-regulación (revisado en ⁴³).

A continuación, en las siguientes secciones, se presentará la información existente sobre el panorama global de los efectos que el ejercicio puede generar sobre la composición y función celular del SI.

2.1.1 Ejercicio agudo y células de la inmunidad innata

2.1.1.1 Macrófagos: la información acerca de estas células indica un incremento en torrente sanguíneo durante y posterior a la cuota de ejercicio realizado ^{7,29,30,49,50}. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado la existencia de un comportamiento dual por parte de los diferentes elementos del sistema inmunitario con respecto al ejercicio. En

su investigación, Ferreira et al. (2010) demostraron que el ejercicio de baja y moderada intensidad disminuyen la subpoblación de macrófagos en la cavidad peritoneal de ratas tras una primera cuota aguda y exhaustiva. A pesar de ello, al medir la misma población de macrófagos en animales que habían sido previamente entrenados, el efecto de la misma cuota de ejercicio fue opuesto. Por lo que la relación entre el ejercicio y los macrófagos podría estar dictada por la intensidad y cronicidad con que se lleve a cabo la actividad física^{19,21,29,47,50}.

2.1.1.2 Neutrófilos: la información correspondiente a neutrófilos es sólida^{29,30,51-54} y esta dicta que durante el ejercicio la población de neutrófilos se incrementa, aumento que puede sostenerse hasta 9 horas después de terminada la sesión³⁰. Aunado a esto, el incremento de neutrófilos parece ser independientemente de la intensidad del ejercicio, a intensidad moderada (70% del umbral de ventilación) o alta (90% del umbral de ventilación), además de no fluctuar dependiendo de la existencia de acondicionamiento físico o no⁵⁴.

2.1.1.3 Natural killers: las células NK presentan un comportamiento particular ante el ejercicio, incrementando a la par de la intensidad de las cuotas de ejercicio (75-112% del consumo máximo de oxígeno.)⁵⁵⁻⁵⁷. Aunado a esto, el aumento no sólo es numérico, sino que el incremento está dado en el fenotipo CD67+/CD57+, correspondiente a células NK maduras, poseedoras de una capacidad lítica mayor^{54,58}. Otros aspectos de las células NK han sido explorados, como su capacidad proliferativa, la cual se ha encontrado aumentada tras una cuota de ejercicio extenuante (112% de capacidad respiratoria máxima)⁵⁶. Resultados similares sugieren que la capacidad lítica de células NK incrementa tras una cuota de ejercicio intenso¹⁸.

2.1.2 Ejercicio agudo y células de la inmunidad adaptativa

2.1.2.1 Linfocitos T: la cinética que sigue esta población durante una cuota de ejercicio es similar a la de macrófagos y neutrófilos, incrementando durante la actividad física y decayendo lentamente por espacio de unas horas tras su finalización^{53,59-64}. El

cambio numérico de esta población es dependiente de la intensidad a la que se lleve a cabo el ejercicio, cuando éste es realizado a una intensidad baja no se observa modificación en la subpoblación ⁵³, sin embargo, a intensidades moderada o alta (70-90% VO2 max.) se aprecia su incremento de hasta un 48% ⁵⁵. A su vez, estudios recientes han sugerido que la diferenciación y maduración de estas células también son promovidas por el ejercicio de alta intensidad y a medida que se incrementa la intensidad o se prolonga la cuota de ejercicio hasta un nivel exhaustivo se favorece el desarrollo de células con un fenotipo anti inflamatorio (Th2 y células T reguladoras) ⁶⁵.

En el 2016 un meta-análisis concluyó que la capacidad proliferativa de linfocitos T es sensible a intensidad y duración del ejercicio, siendo en este caso los niveles exhaustivos, ya sean por duración o intensidad, los que disminuyan esta capacidad en la subpoblación celular en cuestión ⁶⁶. Por el contrario, en estudios donde se realiza una cuota de ejercicio a intensidad moderada se observa un aumento en la capacidad proliferativa ^{16,67}.

2.1.2.2 Linfocitos B: la relación de esta subpoblación celular con el ejercicio ha sido menos estudiada en comparación con aquella dedicada a los linfocitos T. Al igual que ocurre con la mayoría de subpoblaciones, la información respecto a linfocitos B y su comportamiento durante el ejercicio es variable, sin embargo, la mayoría reporta que altas intensidades disminuyen la cantidad de estas células en diferentes tejidos, mientras que intensidades moderadas incrementan su número ^{20,55}. Su capacidad proliferativa parece mantener la misma relación, viéndose favorecida con el ejercicio a intensidades moderadas (60-75%) y disminuyendo a intensidades altas ^{67,68}, efecto que en otras investigaciones ha sido explorado y se responsabiliza a la disminución de sustratos energéticos y a un desbalance redox ⁶⁹.

Por último, la expresión de diversos marcadores moleculares que se asocian con activación y reactividad se han encontrado aumentados en la superficie de estas células, en organismos ejercitados moderadamente y de forma crónica ^{61,67}.

2.1.2.3 Linfocitos T citotóxicos: esta subpoblación celular incrementa durante y posterior a cuotas de ejercicio intenso ^{30,51,55,70,71}. Aunado a esto, algunos trabajos sugieren

que dicho incremento se da particularmente en células con el fenotipo CD8+/CD62-/CD11high y CD27-, consideradas células activadas o de diferenciación tardía^{53,60}. Al igual que en otras subpoblaciones, tal fenotipo corresponde a células activadas y más reactivas^{53,60,71,72}.

Por otro lado, el ejercicio moderado parece no impactar en la composición de esta población, pero sí en su producción de interleucinas, viéndose incrementadas: IL2, IFN γ , TNF α , IL6, IL4 e IL10^{71,72}.

2.1.3 Ejercicio crónico y componentes del SI

Los efectos que el ejercicio crónico ocasiona sobre el SI han sido menos estudiados, pese a que la información existente indica que sus efectos pueden ser contrastantes con aquellos ocasionados por cuotas de ejercicio agudo.

2.1.3.1 Macrófagos: un estudio realizado por Ferreira et al.⁴⁹ demostró que el acondicionamiento previo a una cuota de ejercicio es la clave para generar un incremento de macrófagos peritoneales, mientras que animales sin previo acondicionamiento mostraban una disminución de dicha subpoblación tras las misma cuota de ejercicio. Sorprendentemente, su actividad fagocítica, se halló incrementada a más del 80% tras la cuota de ejercicio, sin importar la existencia de habituación previa..

Otro estudio mostró que el acondicionamiento físico en ratones (ejercicio aeróbico crónico/moderado) confiere una menor morbilidad y mortalidad al ser comparados con ratones que no habían sido ejercitados previo a la inoculación con virus HSV-1. Una vez que los macrófagos fueran eliminados con clodronato encapsulado en liposomas, los efectos positivos del ejercicio fueron erradicados, demostrando que dicha protección era atribuible a los macrófagos²¹.

2.1.3.2 *Neutrófilos*: esta población parece ser poco responsiva a diferentes paradigmas de ejercicio. Sin embargo, algunos estudios longitudinales han demostrado que sujetos entrenados por más de 10 años poseen una cuenta menor de estas células comparados con personas sedentarias. Pese a que la realización de una cuota de ejercicio incrementó el número de células de dicha subpoblación en ambos grupos, el déficit inicial por parte del grupo acondicionado se mantuvo ⁵².

De la misma manera se ha demostrado que aspectos funcionales conferidos por una vida activa hacia estas células son capaces de ser conservados incluso por 2 meses posteriores a la interrupción del ejercicio, siendo esto cierto para funciones como la quimiotaxis y la fagocitosis ⁷³.

2.1.3.3 *Células NK*: se ha demostrado que un ejercicio crónico voluntario en ratones produce una mayor actividad antitumoral por parte de estas células. En este experimento se determinó que aquellos animales a los cuales se les permitía ejercitarse mostraban una reducción tanto en la incidencia como en el crecimiento de tumores cercano al 60% para los dos parámetros. A su vez dicho efecto fue bloqueado una vez que se eliminaron las células NK en los animales ejercitados ⁷⁴.

2.1.3.4 *Linfocitos T*: la ejecución de ejercicio crónico y moderado, pareciera favorecer en linfocitos T a fenotipos proinflamatorios y más activos (CD28+) en humano ⁶³. Mientras que en rata se observa un efecto similar, favorecido un fenotipo CD54+/CD30 ⁶⁷. No obstante existen datos contrastantes, en donde se ha reportado que una ejercitación crónica a intensidades altas favorece un fenotipo CD4+/CD25 en ratones que diferente a los dos casos anteriores, favorecería una respuesta reguladora ⁶⁴, resaltando la variabilidad de efectos que diferentes paradigmas de ejercicio pueden tener sobre el SI.

2.1.3.5 *Linfocitos B*: algunas funciones de esta subpoblación celular también son afectadas por el ejercicio crónico. Estudios recientes han demostrado que el ejercicio crónico moderado favorece la capacidad proliferativa de estas células ⁶⁷, al igual que la producción de IgG, IgM, e IgA ^{75,76}, lo cual a su vez se traduce en una mejora en el sistema de reconocimiento y memoria en aquellos individuos ejercitados, incrementando la producción

de IgM específicas a un antígeno hasta en un 190% al compararse con grupos control no ejercitados ⁷⁷. De forma contraria, la práctica crónica de ejercicio a altas intensidades es capaz de mermar la capacidad proliferativa de estas células ⁶⁹.

A continuación en la figura 2, se encuentra una abstracción de la información provista en esta sección de la tesis. Dividiendo el efecto que el ejercicio a distintas intensidades tiene sobre las distintas poblaciones celulares del SI.

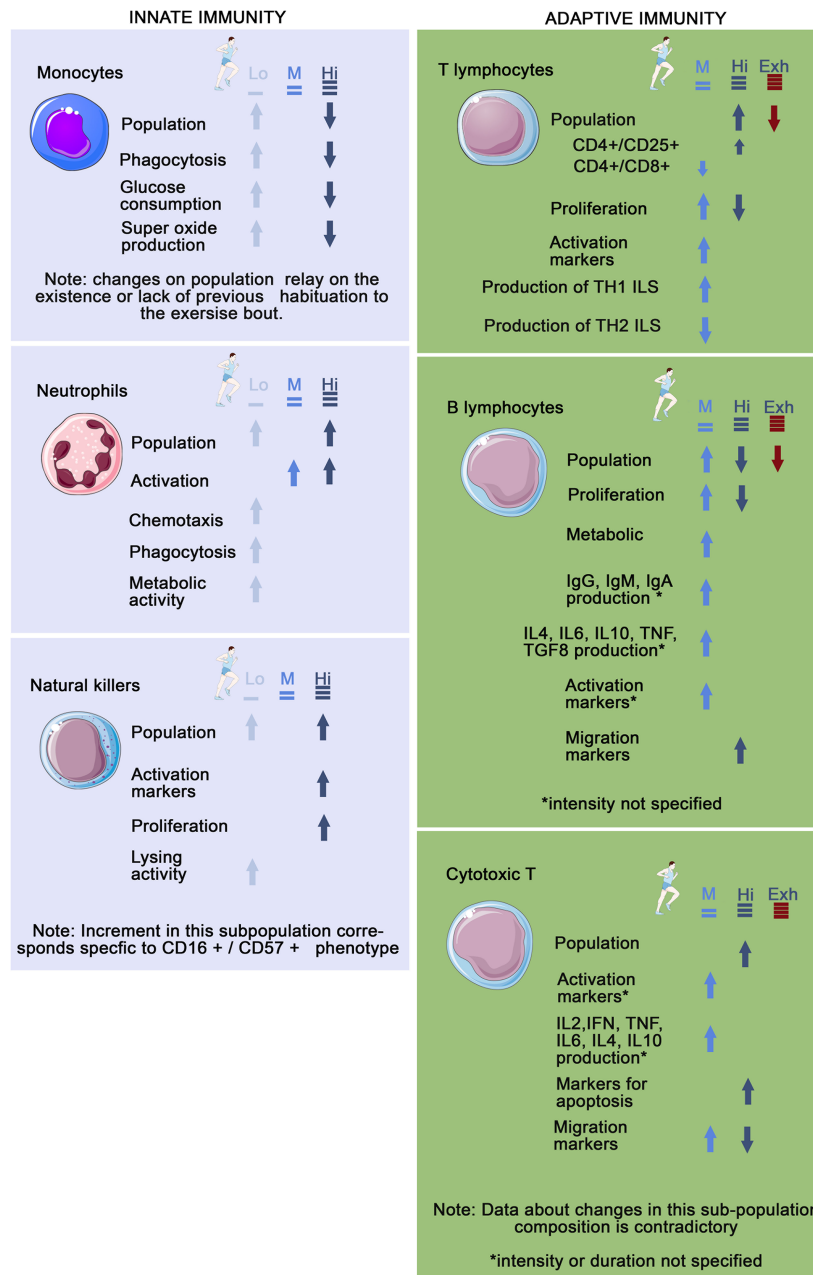


Fig. 2 Efecto del ejercicio sobre diversas subpoblaciones celulares del SI bajo diferentes paradigmas de ejercitación. Paneles en azul claro contienen información sobre células correspondientes a la inmunidad innata, mientras que paneles color verde contienen información de células correspondientes a la inmunidad adaptativa. Intensidades del ejercicio a la que se obtiene el efecto descrito se abrevia: Lo (baja), M (media), Hi (alta) y Exh (extenuante). Flechas hacia arriba indican aumento de la característica señalada o de la población celular, lo contrario para flechas hacia abajo (Imagen tomada de ⁴³).

2.2 El sistema canabinérgico como potencial inmunomodulador durante el ejercicio

Al igual que otros sistemas, el CBS también es afectado por la realización del ejercicio. Algunos estudios han reportado un incremento sutil, pero significativo de anandamida (ANA) en sangre posterior a una cuota de ejercicio aeróbico, independientemente de que se tratara de correr o ciclismo^{78,79}. Posteriormente en 2012 un equipo de trabajo replicó el experimento en condiciones más controladas y determinó un incremento de ANA junto con palmitoiletanolamida y oleoiletanolamida, también endocannabinoides, incremento que se prolongó incluso 15 minutos posterior a la finalización de la cuota de ejercicio⁷⁸. Aunado a lo anterior, ambos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en las células y órganos del SI, con una expresión variable según cada subpoblación celular y estado de activación^{42,80,81}.

Cuando los CBR son activados en células del SI son capaces de producir alteraciones en su funcionamiento. Estas acciones moduladoras han sido reportadas tanto *in vivo*⁸¹ como *in vitro*^{82,83}. El inicio del estudio de las acciones inmunomoduladoras del CBS se remonta a los años 70, con la aparición de algunos reportes que sugerían la relación entre el uso del cannabis con una mayor incidencia de enfermedades virales y episodios de alergia, posteriormente surgieron estudios realizados con animales que comprobaban una resistencia reducida a contraer infecciones (revisado en⁴²). Actualmente se sabe que el CBS genera un potente efecto sobre la proliferación de leucocitos, así como en la producción de ILs y en la activación de células del SI. No obstante, algunos trabajos de investigación han llegado a demostrar un carácter bifásico por parte de ligandos canabinérgicos exógenos, como THC y diversos agonistas sintéticos como CP55940 y WIN552122, en donde concentraciones altas (fisiológicamente irrelevantes) poseen un efecto supresor en el SI y dosis bajas en el rango de nanomoles poseen un efecto activador del sistema^{35,42,84,85}.

Otros estudios han mostrado que la activación de CB2 afecta la migración de células dendríticas *in vitro* e *in vivo* a través de la inhibición de la producción de la proteína de matriz metaloproteinas-9, lo que atenúa cuadros de inflamación aguda. Por lo que se considera que la activación de este sistema contribuye al restablecimiento homeostático en

términos inflamatorios⁸⁶. Otro experimento acorde fue realizado por Massi y colaboradores (2000) quienes demostraron que la administración in vivo de THC es capaz de inhibir la actividad citolítica de células NK sin afectar su proliferación, efecto que se halló principalmente mediado a través de la activación de receptor CB1⁸⁷. Sobre esta misma línea, la participación de CB2 ha sido bien documentada en la reducción de la producción de interleucinas proinflamatorias mediante ANA, la cual actúa por medio de las vías de señalización ERK1,2 y JNK¹⁷.

La expresión de ambos CBR es sumamente variable para cada subtipo celular del SI, esto ha sido determinado a través de la expresión del RNAm de los mismos³⁵, tanto en humano como en ratón⁸⁸. Por otro lado, la expresión de los CBR se encuentra relacionada con la etapa de diferenciación celular de distintas subpoblaciones del SI, lo cual sugiere que juegan un papel importante en la modulación de su función, así como en los procesos de activación celular (revisado en⁴² y⁸⁵).

Por último, la expresión de los CBR parece ser sensible al tipo de mecanismo a través del cual han sido activadas células provenientes del bazo ó esplenocitos, por ejemplo: la expresión de CB1 puede ser disminuida en esplenocitos totales al ser estimulados con Ionomicina/PMA y anti CD3, mientras que la exposición de las mismas células ante anti-CD40 aumenta su expresión^{88,89}. Lo que en acuerdo a lo expuesto anteriormente, nos lleva a suponer que variaciones sutiles en la expresión de CBR pueden determinar la composición y funcionamiento del SI (Fig. 3).

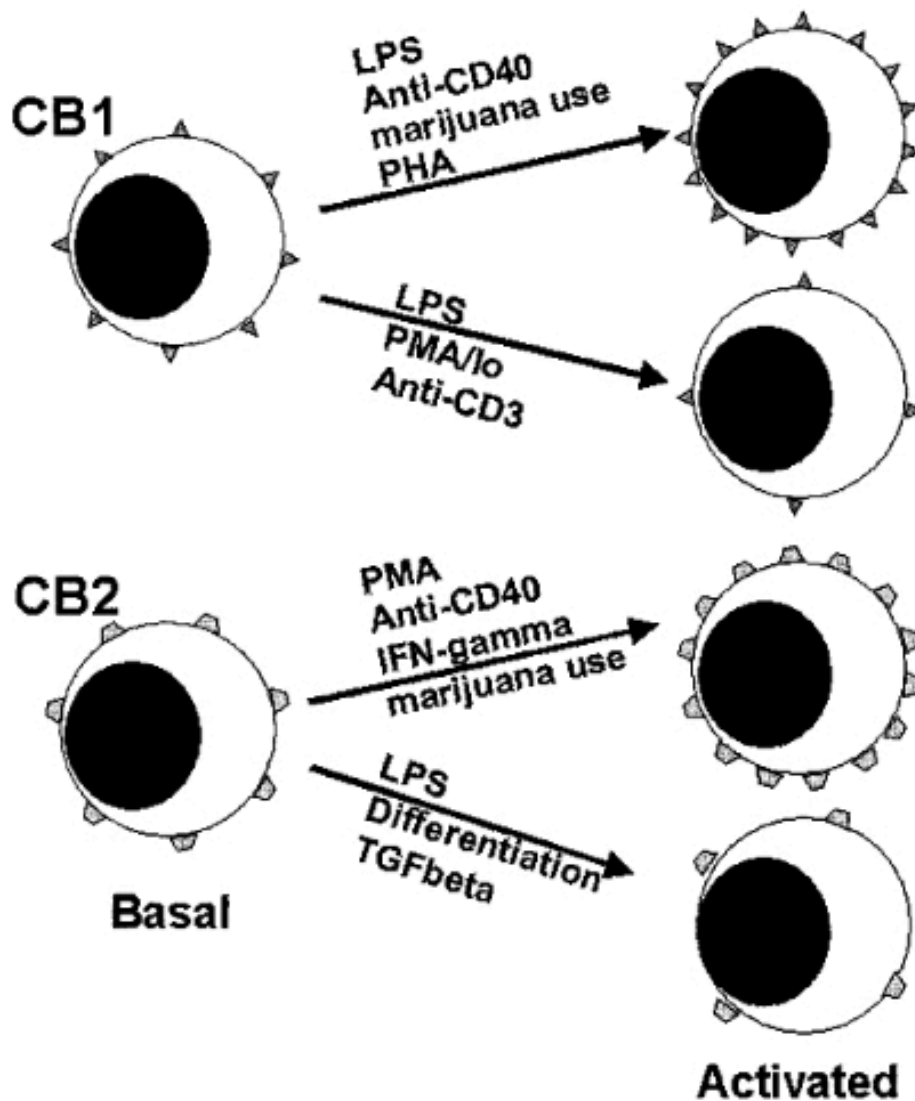


Fig. 3 La expresión de los receptores CB1 y CB2 (representada por triángulos y trapecios en la superficie de las células) varía posterior a la activación celular. Estímulos que incrementan CB1 son: LPS, anti CD40, PHA, y el consumo de marihuana; agentes que suprimen CB1 son: PMA/Ionomicina y anti CD3. Estímulos que incrementan CB2 son PMA, anti CD40, IFN- γ y el consumo de marihuana; agentes que suprimen CB2: LPS, diferenciación celular, factor de crecimiento transformante TGF- β , PHA y fitohemaglutinina (tomado de ³⁵).

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cambios que el SI sufre tras la realización del ejercicio es un tema abordado con anterioridad, sin embargo, la variabilidad de los resultados arrojados por las numerosas investigaciones previas resaltan la incapacidad de generalizar los efectos que la actividad física es capaz de producir sobre el SI. Nuestro estudio se enfoca particularmente, en analizar los efectos que el ejercicio crónico a una intensidad moderada tiene sobre el SI, ya que un 30% de la población mundial opta por ejercitarse de esta forma, además de estar demostrado que un paradigma de ejercicio crónico es capaz de generar un efecto de entrenamiento, ocasionando efectos más intensos y duraderos que cuotas de ejercicio agudas. Por lo que nuestro estudio se centra en aquellos cambios duraderos (más de 24 horas) producidos por el ejercicio crónico sobre la composición de diversas poblaciones celulares del sistema inmunológico, a través del uso de marcadores moleculares modernos y analizados por citometría de flujo, así como en la evaluación su desempeño, por medio de ensayos de proliferación y actividad citotóxica *in vitro*. Aunado a lo anterior, nuestro trabajo pretende determinar si el ejercicio crónico a intensidad moderada es capaz de alterar la expresión de los CBR (poseen relevancia inmununo-modulatoria) en estas mismas poblaciones celulares del SI. Incorporando al sistema canabinérgico en la plétora de factores moleculares con relevancia en la inmuno-modulación por el ejercicio crónico.

4 HIPÓTESIS

El ejercicio crónico a intensidad moderada altera la composición de las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico en el bazo, la expresión de los CBR en su superficie y mejora su funcionamiento, en términos de capacidad proliferativa y citotóxica.

5 OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos del ejercicio crónico a intensidad moderada sobre el sistema inmunológico y la expresión de los CBR en sus distintas subpoblaciones celulares.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto que tiene la ejercitación crónica a intensidad moderada sobre los porcentajes de subpoblaciones de esplenocitos: linfocitos T, linfocitos B, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T citotóxicos, células NK y macrófagos en bazo de ratas macho adultas por medio de citometría de flujo.
- Determinar el efecto que tiene la ejercitación crónica a intensidad moderada sobre la proliferación de esplenocitos *in vitro* mediante su estimulación con PMA/ionomicina.
- Evaluar el efecto de la ejercitación crónica a intensidad moderada sobre la actividad citotóxica de células NK *in vitro*.
- Analizar la variación en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en las subpoblaciones estudiadas como consecuencia del ejercicio crónico a intensidad moderada por medio de citometría de flujo.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

Para este estudio, se usaron ratas macho Wistar en un rango de peso entre 250-300gr. Los animales procedieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los animales se mantuvieron en el *vivarium* del mismo instituto con temperatura controlada (22°C) y en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con agua y Purina LabDiet chow 5015 *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical después de ser anestesiados con pentobarbital sódico (Pisabental®, México).

7.2 Protocolo de ejercitación

Los animales fueron destinados a uno de tres posibles grupos experimentales: ejercitados (EXE), control de rueda (CR), y sedentarios (SED). Animales pertenecientes al grupo EXE realizaron una sesión de ejercicio diario (correr) dentro de una rueda motorizada 5 veces a la semana por un periodo de 10 semanas, para lo cual una previa habituación de 1 semana fue llevada a cabo. Durante la semana de habituación los animales fueron colocados dentro de la rueda motorizada, posteriormente se hacía funcionar durante 5 minutos a mínima capacidad (4m/min). Una vez que el periodo de habituación era completado los animales comenzaron a ser entrenados. El primer día de entrenamiento los animales corrían a una velocidad de 7.5m/min por un lapso de 10 minutos. En los días posteriores, la duración y velocidad a la que los animales corrían era escalada gradualmente hasta alcanzar a la cuarta semana una velocidad de 15m/min y una duración de 40 minutos diarios. Las semanas restantes de entrenamiento transcurrieron sin incrementar la velocidad o duración.

Por otro lado, los animales incluidos en el grupo de CR fueron colocados dentro de la rueda motorizada, la cual se hacía funcionar a mínima capacidad (4m/min) por 10 minutos al día a la misma hora que los animales del grupo EJER eran entrenados (10 semanas). Este grupo fue considerado para detectar los posibles efectos que el contexto de ejercitación y manipulación podrían estar ocasionando sobre los parámetros estudiados en este trabajo.

Los animales correspondientes al grupo SED fueron mantenidos en el *vivarium* bajo condiciones estándar por el mismo tiempo que los animales de los otros dos grupos.

Al final del periodo de entrenamiento todos los animales, independientemente del grupo experimental al que pertenecieran, fueron permitidos descansar por un día con la finalidad de eliminar cualquier posible efecto transitorio que la ejercitación aguda hubiera ocasionado y de tal manera, asegurarnos de considerar únicamente los cambios que duraran más de 24 horas. Un día posterior a aquel destinado al descanso de los animales, estos fueron sacrificados y las muestras correspondientes extraídas.

7.3 Citometría de flujo

El bazo fue disgregado manualmente utilizando una maya de nylon (50µm de apertura en la malla), posteriormente las células fueron resuspendidas en PBS. Tanto a las muestras de sangre como a las células del bazo (resuspendidas) se les agregó buffer de lisis ACK (150 mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3) y fueron mantenidas por 10 minutos para eliminar el exceso de eritrocitos. Finalmente, las muestras fueron lavadas con buffer de FACS (PBS, FBS, 0.02% NaN₃).

Aproximadamente 1x10⁶ células fueron incubadas con los siguientes anticuerpos con la finalidad de conocer su identidad y proporción de la subpoblación a la que pertenecen: Alexa Fluor® 488-conjugado- anti rat CD3 (IF4, Biolegend), PE Cy5-conjugado- anti rat CD4 (biolegend), PE-conjugado anti rat CD8a (Biolegend), PE-conjugado – anti rat CD45RA (Biolegend), Alexa Fluor® 647-conjugado- anti rat CD161 (biolegend), biotin-conjugado- anti rat CD11b/c (OX-42, Biolegend), PE-conjugado anti rat TCR (V65, Biollegend).

Para el marcaje de los receptores a cannabinoides se usaron los anticuerpos primarios policlonales: rabbit anti CBI (abcam®) y rabbit anti CBII (abcam®). Seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios: AlexaFluor® 488- conjugado goat anti rabbit

IgG (ThermoFisher Scientific) and DyLight® 649- conjugado- anti rabbit IgG (Vector laboratories).

7.4 Ensayos de proliferación

Los esplenocitos totales fueron obtenidos como se describió en el apartado anterior (Citometría de flujo) y contados mediante el uso de una cámara Neubauer. Posteriormente las células fueron marcadas con el kit Cell Trace™ CFSE cell proliferation kit (Invitrogen™), un éster que permea a través de las membranas celulares y que al reaccionar con los grupos amino se hace fluorescente. El CFSE se distribuye de manera homogénea entre las poblaciones celulares resultado de la división celular, por lo tanto, permitiendo rastrear las generaciones de células en división por medio de su intensidad de fluorescencia. El CFSE fue usado de acuerdo con el protocolo del fabricante y la reacción detenida con medio RPMI-1640 (ATCC® 30 2001™).

7.5 Cultivo celular

La línea celular YAC 1 (ATCC® - TIB 160™) fue cultivada en medio RPMI 1640 (ATCC® 30-2001™) suplementado con suero fetal bovino al 10% (SFB, ATCC® 30-2020™), mantenidas con aire al 95%, de dióxido de carbono (CO₂) 5%. Y mantenidas a una temperatura de 37°C. Las células Yac 1 fueron expandidas por una semana tras su descongelación, contadas con una cámara de Neubauer y marcadas con el kit CFSE para su posterior uso en los ensayos de citotoxicidad.

7.6 Ensayos de citotoxicidad *in vitro*

Las células Yac 1 fueron marcadas con el kit CFSE™ de acuerdo con el protocolo de los productores para posteriormente ser usadas como células diana en el ensayo. Se obtuvo una suspensión celular tras la disgregación del bazo obtenido de las ratas correspondientes a

cada grupo experimental, y posterior a su entrenamiento (o ausencia de este en el caso de los grupos controles). Los esplenocitos fueron contados en una cámara de Neubauer y ajustada su cantidad al volumen deseado para fungir como las células efectoras en nuestro ensayo. Finalmente, ambas poblaciones celulares, efectoras y células diana, fueron co-cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10% durante 4 horas en placas de 96 pozos. Posterior al co-cultivo, las células fueron removidas del incubador y marcadas con yoduro de propidio seguido de lavados con buffer de Facs. La adquisición de la información llevada a cabo en un citómetro Attune (Life technologies) y el análisis de los datos analizados con el software FlowJo (Treestar Inc.).

7.7 Determinación de los niveles de corticosterona y de IgG en suero

Los animales fueron anestesiados y sacrificados un día posterior de haber concluido con su condición experimental. La sangre fue extraída por medio de punción cardiaca e inmediatamente posterior a su recolección, ésta fue centrifugada a 4000rpm para separar y colectar el suero de la sangre. Posteriormente, el suero fue dividido en dos alícuotas y almacenado a -70°C para su uso posterior. Los niveles de corticosterona fueron determinados por medio del Corticosterone ELISA kit, y los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo al protocolo de los fabricantes. El establecimiento de los niveles de IgG en suero fue realizado en una placa de 96 pozos con fondo redondo. La placa fue previamente sensibilizada con una disolución del suero (1:1000), se lavó y bloqueó con una solución de albúmina al 1%. Se prosiguió con la incubación de los anticuerpos α IgG rat HRP por 2 horas, y una vez que dicho periodo hubo terminado se realizaron los lavados, en seguida el cromógeno fue añadido a los pozos. Posterior a la detención de la reacción con el cromógeno, la placa fue leída con un lector para placas Stat Fax 4200 microplate reader (Awariness Technology).

7.8 Análisis de datos

El análisis de los datos correspondientes a los cambios en las subpoblaciones celulares se realizó por medio de un ANOVA de una vía, seguido del test post-hoc, Tukey. Las diferencias encontradas fueron consideradas significativas cuando “ $p < 0.05$ ”, mostrando el valor de “p” y “n” correspondiente para cada subpoblación en cada pie de figura. Previo a la determinación de la prueba estadística (ANOVA) como herramienta para analizar nuestros datos, comprobamos la normalidad de su distribución mediante el test Shapiro-Wilk. Un proceso similar fue llevado a cabo para el análisis de los datos correspondientes a los ensayos de proliferación y citotoxicidad, al igual que con aquellos correspondientes a los niveles de IgG en suero. Para la determinación de los cambios en la expresión de los CBR se llevó a cabo un ANOVA de dos vías, con un $\alpha = 0.05$, dada la consideración de dos variables independientes (grupos y CBR). Además se realizó un análisis post-hoc Bonferroni con los mismos criterios de significancia. La información de todos los experimentos fue graficada como media \pm error estándar. Todos los análisis fueron hechos en el software Prism 5 para Mac (GraphPad Software Inc.)

8 RESULTADOS

8.1 El ejercicio crónico a intensidad moderada altera la composición de las subpoblaciones de esplenocitos

La determinación de cambios en la composición celular del sistema inmune en un individuo, es un buen parámetro que puede proveernos de información sobre su estado actual, indicando deficiencias o alteraciones generales del mismo. Por lo tanto, decidimos evaluar diversas subpoblaciones celulares del SI en bazo. Las subpoblaciones celulares analizadas correspondientes a la respuesta inmune innata fueron: Natural killers (CD161+) y macrófagos (CD11b+), subpoblaciones en las cuales no hayamos cambios significativos atribuibles al entrenamiento físico (Fig. 4). Las células analizadas correspondientes a la respuesta inmunitaria adaptativa fueron: Linfocitos T (CD3+), linfocitos T helpers (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+), linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta$) y linfocitos B (CD45 RA+). Para aquellas células estudiadas, los análisis por citometría de flujo reflejaron una disminución de las subpoblaciones de linfocitos T helper (CD4+) dentro de la población de linfocitos T (CD3+) y en linfocitos B (CD45 RA+) en el grupo de animales EJER al ser comparado con los dos grupos control, SED y CR (Fig. 5 y 6), por lo tanto, considerando dichos cambios un efecto del ejercicio. Por otro lado, los linfocitos T $\gamma\delta$ mostraron un incremento en aquellos animales del grupo EJER en comparación con los grupos SED y CR (Fig. 5), una vez más reflejando un cambio atribuible al entrenamiento realizado por los animales. Aunado a esto los linfocitos T citotóxicos disminuyeron tanto en el grupo CR como en el grupo EJER, al ser comparados con el grupo SED, demostrando que dicha disminución no puede ser atribuida al ejercicio, encontrándose asociada con la exposición a la rueda de ejercitación o a la manipulación de los animales pertenecientes a esos grupos experimentales (Fig. 5). Finalmente, la población general de linfocitos T (CD3+) no presentó ningún cambio significativo entre los grupos analizados.

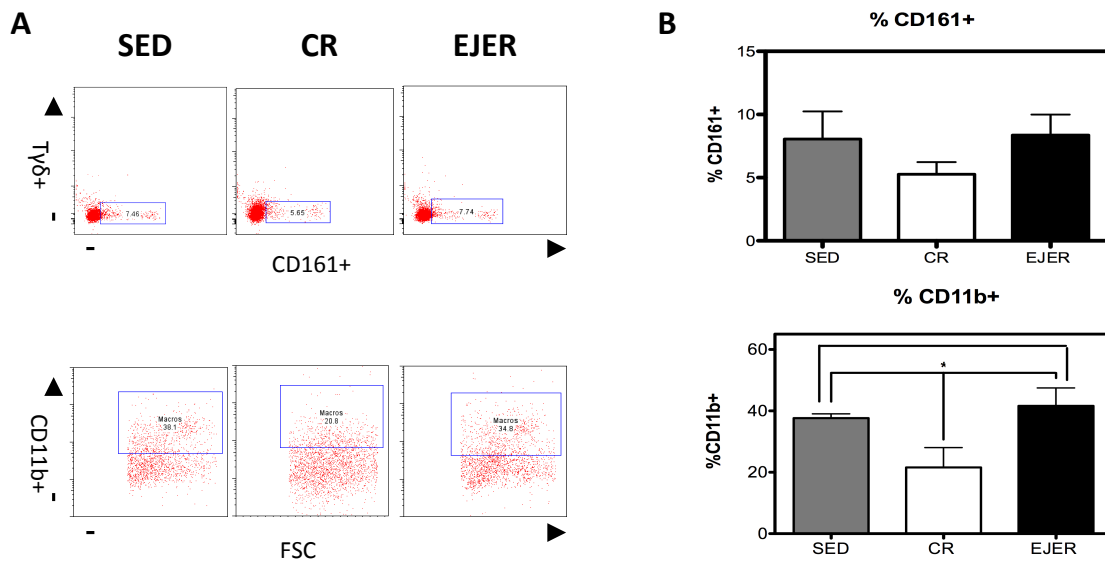


Fig. 4 Composición de las subpoblaciones celulares correspondientes a la inmunidad innata en bazo. A) Representación gráfica con puntos de los eventos analizados por medio de citometría de flujo y los respectivos porcentajes de las subpoblaciones. En cada grafico podemos identificar los ejes X y Y: los cuales representan la medición del detector “forward scatter” (FSC) ó a cualquier receptor capaz de detectar la longitud emitida por el anticuerpo con que hayamos marcado alguna subpoblación celular de nuestro interés. B) Determinación de las subpoblaciones celulares de la inmunidad innata un día posterior a la fecha de conclusión en cada condición experimental para los diferentes grupos: SED, CR y EJER. Ninguna subpoblación presentó diferencias significativas como consecuencia del ejercicio: células NK (CD161+) y macrófagos (CD11b+) (ANOVA, $p=0.3768$, $F=1.010$, $n=10$; ANOVA, $p=0.0273$, $F=4.330$, $n=10$ correspondientemente, los resultados se consideran significativos cuando $p<0.05$).

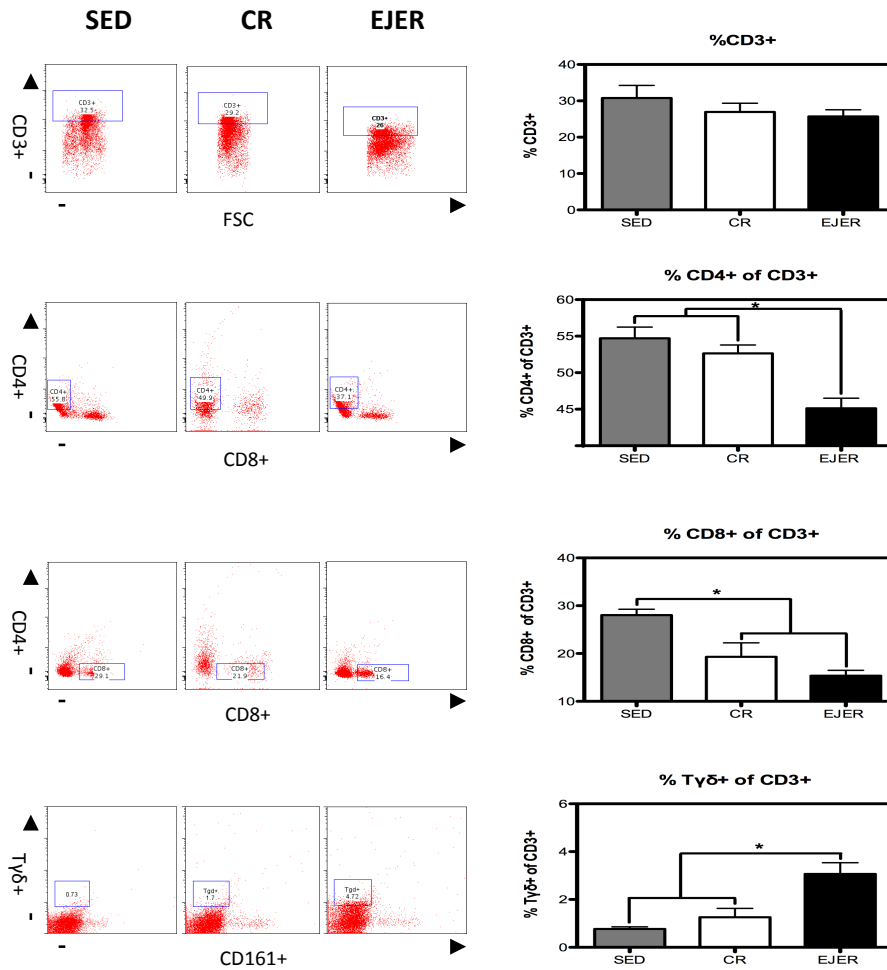


Fig. 5 Cambios en la composición de las subpoblaciones celulares de la inmunidad adaptativa en bazo. A) Gráfica de puntos representativa del análisis por citometría de flujo y los porcentajes correspondientes a cada subpoblación. En cada gráfico podemos identificar los ejes X y Y: los cuales representan la medición del detector “forward scatter” (FSC) ó a cualquier receptor capaz de detectar la longitud emitida por el anticuerpo con que hayamos marcado alguna subpoblación celular de nuestro interés. B) Determinación de las subpoblaciones celulares de la inmunidad adaptativa un día posterior a la fecha de conclusión en cada condición experimental para los diferentes grupos: SED, CR y EJER. Aquellas subpoblaciones que presentaron cambios significativos entre los grupos experimentales fueron: linfocitos T helper (ANOVA, $p=0.0008$, $F=13.60$, $n=5$) y linfocitos $T\gamma\delta$ (ANOVA, $p=0.0002$, $F=12.25$, $n=10$). El * representa diferencia estadística entre los grupos $p<0.05$.

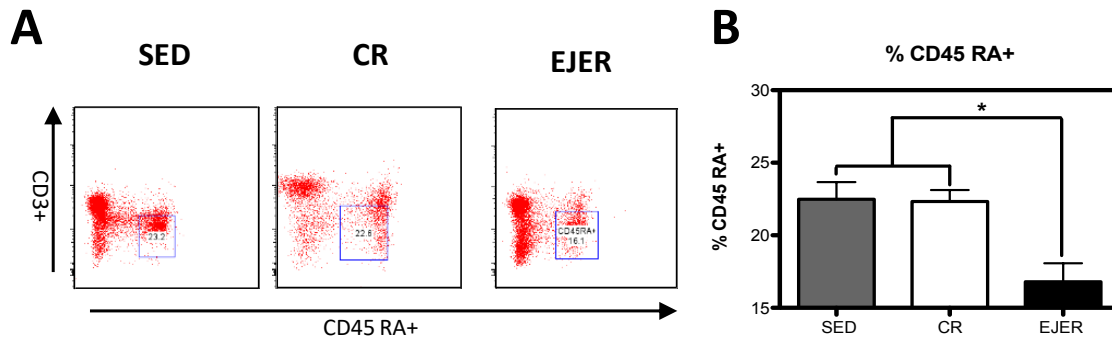


Fig. 6 Cambio en la proporción de linfocitos B en el bazo de animales ejercitados.

a) Gráfica de puntos representativa del análisis por citometría de flujo de la subpoblación celular. b) Determinación de linfocitos B en el bazo de ratas un día después de haber completado su exposición a las diferentes condiciones según los diferentes grupos experimentales: SED, CR y EJER. El análisis estadístico arrojó una disminución significativa de la población de linfocitos B en el grupo de animales ejercitados (ANOVA, $p=0.3601$, $n=10$). * señala una diferencia estadística, $p<0.05$ entre los grupos.

8.2 El ejercicio crónico modifica la expresión de los CBR en splenocitos de animales ejercitados

Decidimos evaluar la expresión de los CBR en distintos componentes celulares del SI en bazo de ratas. Correspondientes a la inmunidad innata se analizaron células NK (CD161+) y macrófagos (CD11b+). Las primeras presentaron una disminución en la expresión superficial de CB2 en aquellos animales pertenecientes a los grupos EXE y CR en comparación con aquellos del grupo SED. La expresión del receptor CB1 en células NK no se vio afectada. Por su lado los macrófagos no presentaron ningún cambio en la expresión de los CBR en la superficie de células del SI entre los grupos experimentales (Fig. 7). Dentro de las células correspondientes a la inmunidad adaptativa, los linfocitos T helpers (CD4+) de los animales en el grupo EXE mostraron una mayor expresión de CB1 en comparación con ambos controles, CR y SED. Ninguna diferencia significativa fue observada para esta subpoblación en cuanto a la expresión de CB2. Caso similar fue el observado en las células $T\gamma\delta$ correspondiente a los animales del grupo EXE, que mostraron una mayor expresión de CB1 con respecto a las células de los animales en grupos CR y SED (Fig. 8), y ninguna diferencia entre grupos en la expresión de CB2. En contraste, no se

encontró ninguna variación en la expresión de CBR en la población de linfocitos T (CD3+) ni en la de linfocitos T citotóxicos (CD8+), cuando los grupos experimentales fueron analizados (Fig. 8).

Por otro lado, la población de linfocitos B mostró un aumento significativo en la expresión membranal de CB2 en las células de los animales pertenecientes al grupo EXE en comparación con ambos grupos controles (CR y SED). Mientras que ningún cambio en la expresión de CB1 fue detectado entre los tres grupos experimentales (Fig. 9).

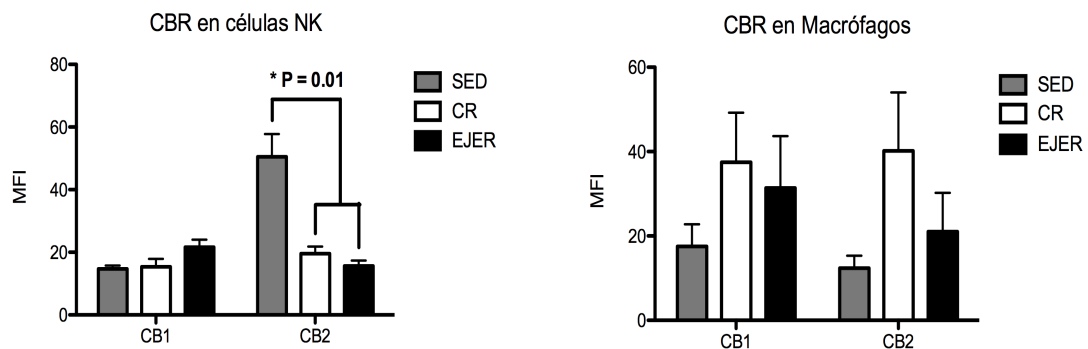


Fig. 7 Expresión de CBR en células NK y macrófagos. Representación gráfica de la mediana de la expresión de los CBR (CB1 y CB2) en subpoblaciones de esplenocitos correspondientes a la inmunidad innata y comparación entre los grupos experimentales: SED (barra gris), CR (barra blanca) y EJER (barra negra). Las líneas que conectan las barras representan las comparaciones entre los grupos y * representa diferencia significativa, $p < 0.05$ ANOVA de dos vías y post-hoc test Bonferroni. En estas subpoblaciones no se encontraron diferencias significativas atribuibles al ejercicio en la expresión de los CBR.

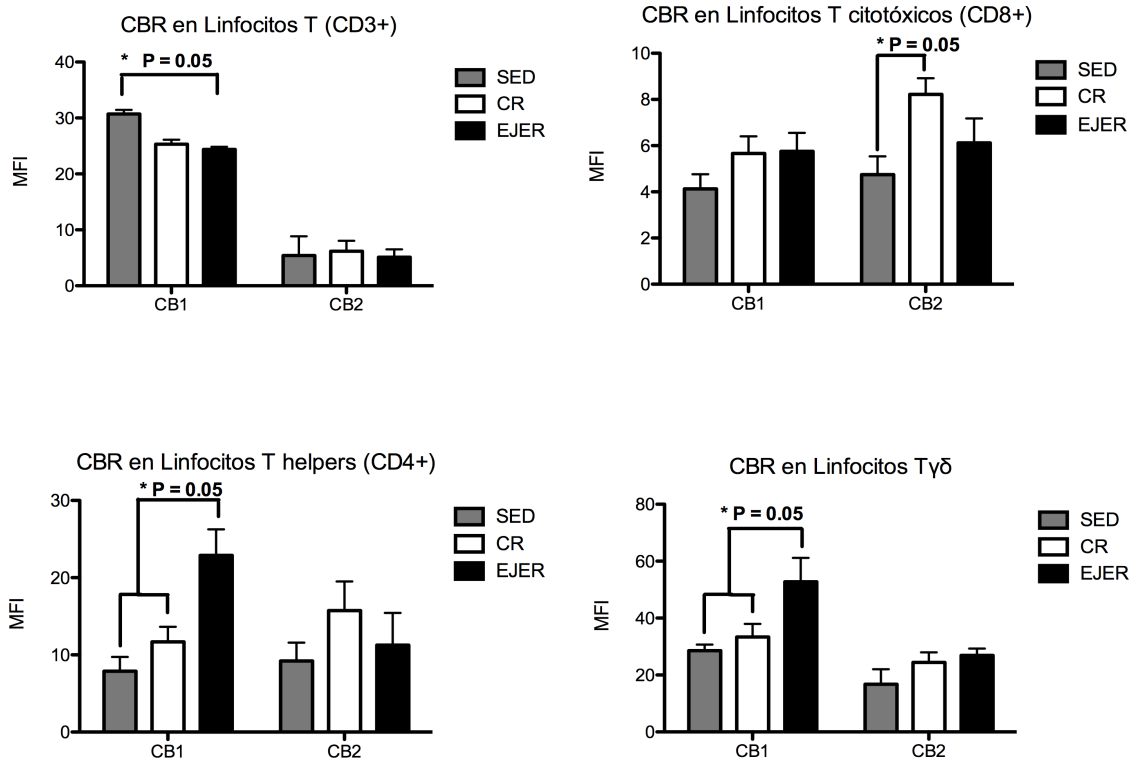


Fig. 8 Expresión de CBR en esplenocitos correspondientes a la inmunidad adaptativa. Representación gráfica de la mediana de la expresión de los CBR (CB1 y CB2) en subpoblaciones de esplenocitos correspondientes a la inmunidad adaptativa y comparación entre los grupos experimentales: SED (barra gris), CR (barra blanca) y EJER (barra negra). Las líneas que conectan las barras representan las comparaciones entre los grupos y * representa diferencia significativa, $p < 0.05$ ANOVA de dos vías y test post-hoc Bonferroni. Las subpoblaciones de linfocitos T helpers y T $\gamma\delta$ presentan diferencias significativas en la expresión de los CBR entre los grupos experimentales ($p = 0.0275$, $F = 3.919$, $n = 8$ y $p = 0.0039$, $F = 6.343$, $n = 8$ respectivamente).

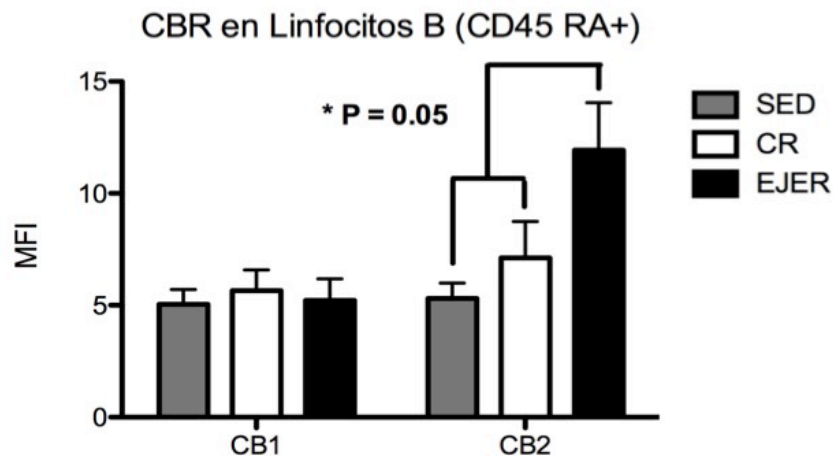


Fig. 9 Expresión de CBR en linfocitos B. Representación gráfica de la mediana de la expresión de los CBR (CB1 y CB2) en la subpoblación de linfocitos B en los animales correspondientes a los diferentes grupos experimentales: SED (barra gris), CR (barra blanca) y EJER (barra negra). Las líneas que conectan las barras representan las comparaciones entre los grupos y * representa diferencia significativa, $p < 0.05$ ANOVA de dos vías y post-hoc test Bonferroni. Las subpoblación de linfocitos B presenta diferencias significativas en la expresión de los CBR entre los grupos experimentales ($p = 0.0030$, $F = 9.638$, $n = 10$)

8.3 Los niveles de inmunoglobulinas G no son alterados por el ejercicio crónico

Las inmunoglobulinas G (IgG) son el tipo más abundantes de inmunoglobulinas y un parámetro utilizado para obtener información sobre el desempeño los linfocitos B. Por ejemplo, un cambio en los niveles de IgG podría representar un proceso infeccioso que se pudiese estar desarrollando en el organismo, o de no ser el caso, que existe una alteración en el funcionamiento normal de los linfocitos B. Debido a la disminución de la población de linfocitos B previamente descrita en este trabajo, decidimos estudiar si la producción de IgG también variaría entre los grupos experimentales. Por lo tanto, llevamos a cabo un ELISA semi-cuantitativo, el cual no arrojó diferencias significativas entre los grupos experimentales (Fig. 10).

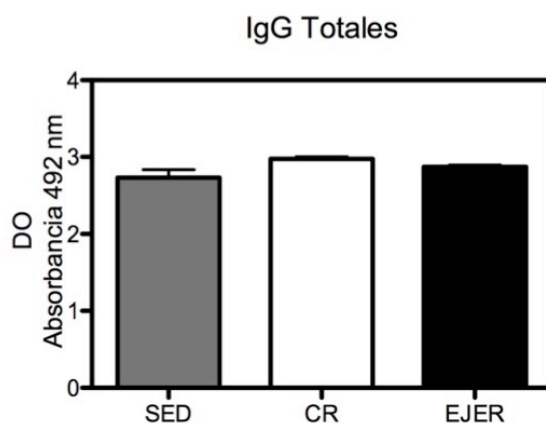


Fig. 10 Los niveles de IgG en suero no son afectados por el ejercicio crónico. El análisis de IgG totales fue realizado para cada grupo experimental por medio de una ELISA semi-cuantitativa. Tras realizar el análisis estadístico de los datos no fueron encontradas diferencias significativas entre los grupos experimentales. ANOVA, $p=0.0676$, $F=3.286$, $n=6$.

8.4 El ejercicio crónico aumenta la capacidad proliferativa pero no la actividad citotóxica de esplenocitos

La capacidad proliferativa de las distintas subpoblaciones celulares del SI, así como la actividad citotóxica de sus células líticas, fueron calculados con la finalidad de determinar la competencia del SI en los individuos de nuestros grupos experimentales. Para establecer si el ejercicio crónico tenía alguna influencia en ambas características se realizaron test *in vitro*. Para los ensayos de proliferación, los esplenocitos totales fueron cultivados en medio RPMI completo (con ionomicina y PMA) por 72 horas. No obstante, la información obtenida no reflejó diferencias significativas al compararse el índice de proliferación entre los tres grupos experimentales (Figura 12C). Por otro lado, los esplenocitos provenientes de los animales en el grupo EJER presentaron una mayor proporción de células en división en comparación con los esplenocitos de aquellos animales en ambos grupos control: CR y SED (Fig. 11B).

Dado los resultados obtenidos previamente, decidimos realizar marcajes específicos en las subpoblaciones del SI que habían cambiado su proporción en los animales del grupo EJER en comparación con los dos grupos control. Los resultados encontrados mostraron que linfocitos B (CD45 RA+) y las células NK (CD161+) de los animales en el grupo EJER exhibieron una mayor proporción de células en división en comparación con los dos grupos control, CR y SED (Fig. 11D).

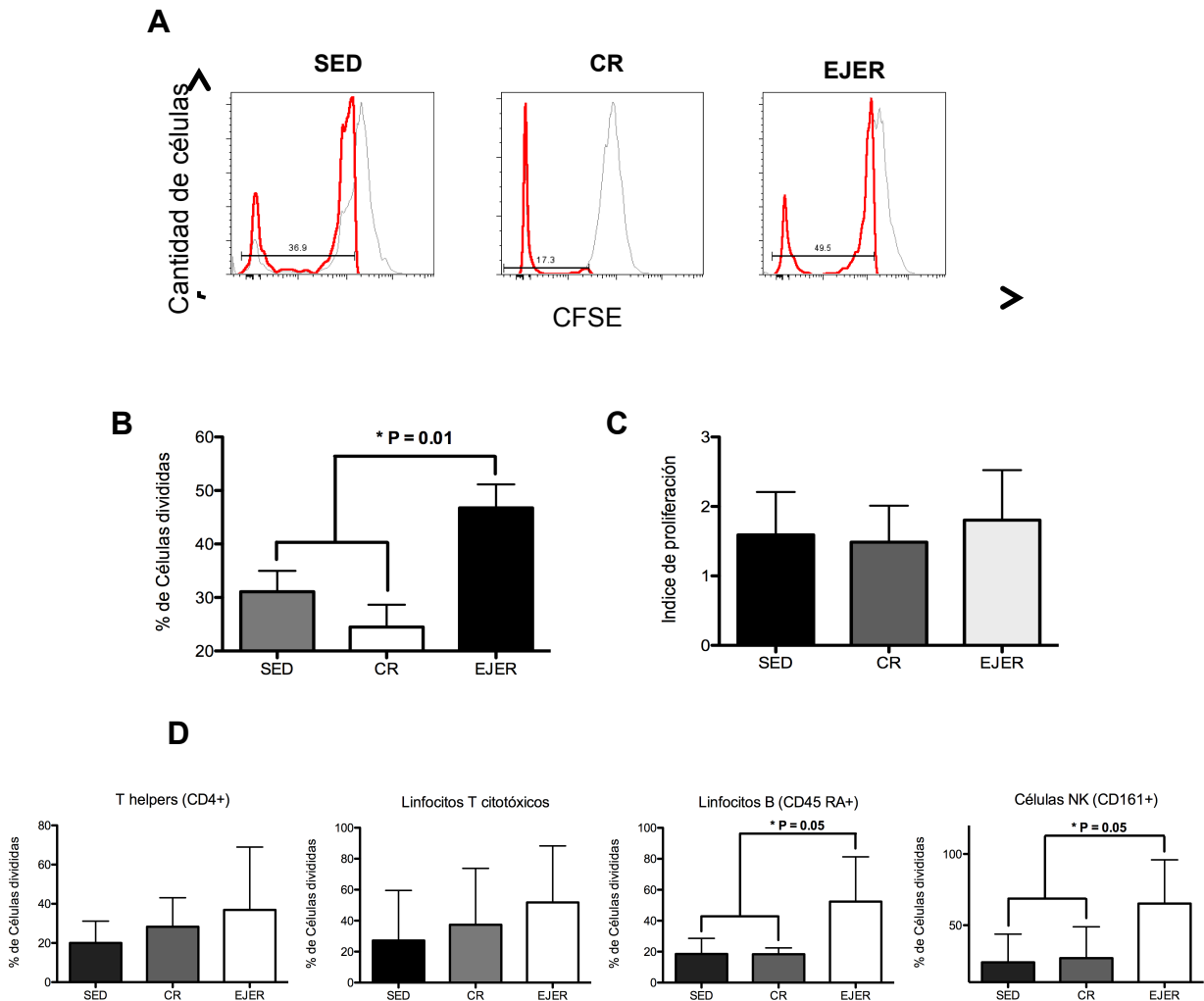


Fig. 11 Efecto del ejercicio crónico sobre la proliferación en esplenocitos totales.

A) Histogramas representativos de las poblaciones celulares proliferantes en el análisis por citometría de flujo. La línea roja representa a la población de células puestas en cultivo con ionomicina/PMA después de 72 horas, mientras que la línea negra mas tenue, representa a la población de células puestas en cultivo en ausencia de ionomicina/PMA. La pérdida de fluorescencia (desplazamiento de la población hacia el origen del plano cartesiano) mantiene una relación directa con la cantidad de divisiones celulares, de tal manera que menor intensidad de fluorescencia indica una mayor proliferación celular. Dos parámetros fueron medidos para determinar la capacidad proliferativa de los esplenocitos: B) proporción de células en división, en donde se observa un incremento en el grupo de animales ejercitados al ser comparados con los animales de los dos grupos controles (ANOVA, $p=0.0092$, $F=8.930$, $n=5$), y C) índice de proliferación, el cual representa el promedio de divisiones que tuvieron los esplenocitos que proliferaron, lo cual no presentó variaciones debido

al ejercicio crónico. D) proporción de células de subpoblaciones específicas: linfocitos T helper y linfocitos T citotóxicos no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales; linfocitos B (ANOVA, $p=0.0006$, $F=7.212$, $n=6$) y células NK (ANOVA, $p=0.0191$, $F=5.213$, $n=6$) del grupo EJER mostraron un incremento significativo en la proporción de células divididas en comparación con ambos grupos controles.

Con el objetivo de establecer la actividad citotóxica de células NK en los animales de los distintos grupos experimentales, se realizó un test *in vitro* haciendo uso de células YAC 1 (células diana) y poniéndolas en co-cultivo con los esplenocitos de los animales de los distintos grupos. Previo al cultivo las células YAC 1 fueron teñidas mediante el uso del kit CFSE, y al final del test las células muertas fueron marcadas con yoduro de propidio, de tal manera que las células con doble marcaje positivo reportaron a las células diana muertas. El ensayo fue llevado a cabo con tres proporciones de células diana/efectoras: 10:1, 50:1, 100:1, y bajo ninguna de las condiciones anteriores el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los grupos (Fig. 12B).

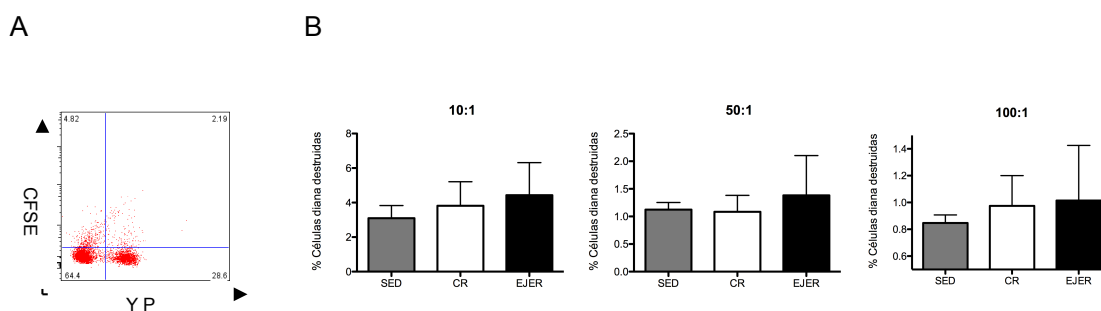


Fig. 12 Actividad citotóxica de esplenocitos totales *in vitro*. A) Diagrama de puntos representativo del análisis por citometría de flujo, las células diana (YAC-1) muertas fueron determinadas por medio del doble marcaje, CFSE+ e IP+. B) La actividad citotóxica de los esplenocitos totales fue calculada a tres distintas proporciones de células efectoras:diana (10:1, 50:1 y 100:1). Ninguna diferencia significativa fue encontrada entre los grupos a ninguna de las proporciones estudiadas.

8.5 Los niveles de corticosterona en plasma no son afectados por el ejercicio crónico

Determinar el nivel de corticosterona en los tejidos de animales es considerado una forma confiable de establecer la cantidad de estrés a las que se les somete. En este trabajo decidimos analizar si los niveles de corticosterona diferían entre los animales de los tres grupos experimentales, reflejando un posible efecto del estrés a largo plazo en aquellos animales ejercitados. A pesar de que es posible visualizar una tendencia en los grupos EXE y CR al ser comparados con el grupo SED, en donde los primeros mostraban niveles elevados de corticosterona en plasma, el análisis post-hoc no arrojó diferencias significativas en la interacción entre los grupos (Fig. 13).

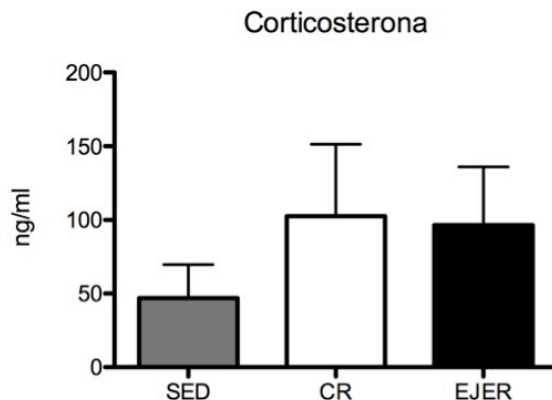


Fig. 13 Concentración de corticosterona en suero. La información es presentada como la media (ng/ml) \pm error estándar para cada grupo. El análisis de varianza determinó que las medias entre los grupos experimentales difieren significativamente, sin embargo el análisis post-hoc no detecta diferencias significativas en la interacción entre grupos. $p < 0.05$, ANOVA, Tukey, $p = 0.0473$, $n = 6$.

9 DISCUSIÓN

Pese a la gran cantidad de estudios que han tratado los alcances inmunomoduladores del ejercicio, ésta es un área que se mantiene como un campo promisorio para incrementar nuestro conocimiento no sólo sobre la fisiología básica sino, de la fisiología durante la enfermedad. No obstante, la mayoría de estudios en esta área han sido enfocados en los efectos que el ejercicio agudo ocasiona sobre el SI ^{16,21,90,91}. Por el contrario, el estudio del ejercicio crónico y sus consecuencias a largo plazo sobre el SI han sido relegados, pese a la existencia de evidencia sugerente de que la cronicidad con que el ejercicio es realizado determina sus efectos sobre este sistema ^{73,92}.

A parte de la cronicidad, la intensidad a la que el ejercicio es realizado representa otro factor que afecta la composición celular del SI, así como su polarización al ser activado, generándose una relación intensidad moderada/fenotipo pro-inflamatorio e intensidad alta/fenotipo anti-inflamatorio ^{16,50,54,90}. Lo que nos llevó a investigar las consecuencias de un modelo de ejercicio popular en la actualidad, ejercicio crónico/moderado, sobre la composición y función de esplenocitos.

En cuanto a la composición de las subpoblaciones celulares, nuestro modelo de ejercitación no alteró a aquellas células del SI innato que fueron analizadas. Sin embargo, las subpoblaciones de linfocitos T helpers y linfocitos B se encontraron disminuidas en aquellos animales del grupo EJER en comparación con ambos grupos control SED y CR, contrario a lo esperado. Opuesto a esas subpoblaciones, linfocitos T $\gamma\delta$ fueron incrementados en los animales ejercitados, estas células se encuentran relacionados con la inmunidad en mucosas, incluyendo al tracto respiratorio superior, idea que va en acuerdo con el mejoramiento de la resistencia a contraer infecciones en estas vías aéreas y opuesto a la frecuente susceptibilidad de contraerlas en sujetos que realizan cuotas de ejercicio extenuante y atletas de alto rendimiento (23,25,27-30). Por su lado, los linfocitos T helper y linfocitos B representan a los elementos más icónicos de la inmunidad adaptativa, así como también importantes elementos en la regulación de la inmunidad innata, por lo que nos preguntamos si la disminución observada por sí sola representaba un SI deficiente por parte de los animales del grupo EJER.

Para determinar el estado funcional de los esplenocitos de los animales correspondientes a cada grupo experimental, realizamos ensayos de proliferación y citotoxicidad *in vitro*. Para el caso del ensayo de proliferación dos parámetros fueron evaluados: el índice de proliferación y el porcentaje de células divididas. El primero representa el promedio de divisiones de las células que proliferaron durante el ensayo, lo cual no arrojó diferencias entre los grupos experimentales. En cambio, el porcentaje de las células que se dividieron fue mayor en el grupo EJER, en comparación con ambos grupos control. En conjunto, esta información puede ser interpretada como que los esplenocitos de los diferentes grupos experimentales no varían su eficiencia para proliferar cuando han sido activados, no obstante, una mayor proporción de ellos en el grupo EJER tienden a proliferar, lo cual podría tratarse de un efecto compensatorio por la menor cantidad de linfocitos T helper y B. El hecho de que hubiese más proliferación por parte de los esplenocitos del grupo EJER nos hizo plantearnos la posibilidad de que dicha diferencia pudiese ser persistente inclusive bajo condiciones basales, lo cual representaría un estado hiper-reactivo incluso en ausencia de un activador o amenaza patológica, por lo que comparamos el porcentaje de proliferación de los esplenocitos entre los grupos experimentales sin la activación por PMA/ionomicina, y los resultados no mostraron diferencias entre grupos, reflejando que el incremento en la proliferación era consecuencia de la activación por PMA/Ionomicina. A continuación, determinamos los porcentajes de proliferación para subpoblaciones específicas: linfocitos T helper, citotóxicos, B's y células NK, encontrando una mayor proliferación en las últimas dos subpoblaciones en aquellos animales ejercitados. Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad para células NK no mostraron diferencias entre los grupos experimentales para ninguna de las proporciones células diana/efectoras. En conjunto esta información podría sugerir que el ejercicio promueve una mayor acción en contra de células transformadas y células infectadas viralmente en aquellos sujetos que lo practican.

La información aquí presentada demuestra que la realización de ejercicio crónico, a intensidad moderada, no merma la capacidad proliferativa de esplenocitos ante una activación con PMA/Ionomicina, ni la capacidad citotóxica de células NK del bazo en animales ejercitados, por el contrario, los esplenocitos de tales animales parecen más

encausados a proliferar una vez que han sido activados que sus contrapartes en aquellos animales de los grupos control. Dicha información en un inicio pareciera ser contradictoria con la disminución de las subpoblaciones linfocíticas (CD4+ y CD45 RA+). No obstante, la disminución de algunas subpoblaciones leucocitarias ya ha sido reportada en sujetos que se ejercitan de manera crónica, sin que dicha disminución ocasione una mayor morbilidad o susceptibilidad a infecciones, lo que indicaría una deficiencia del SI ^{20,52,54}. Esta información sugiere un incremento en la eficiencia celular del SI, indicando que una menor cantidad de elementos es capaz de responder ante las mismas amenazas con la misma eficacia. En nuestro trabajo esta hipótesis también es apoyada por los resultados obtenidos por el análisis de ELISA para calcular la cantidad de IgG, en donde se mostró que el ejercicio no afecta los niveles basales de estas inmunoglobulinas, pese a la marcada disminución de las poblaciones linfocíticas.

Finalmente, los resultados sobre la expresión de CBR en las subpoblaciones celulares estudiadas indican un incremento en la expresión de CB1 en la membrana celular de linfocitos T helper y T $\gamma\delta$, como consecuencia del ejercicio, mientras que linfocitos B presentan una mayor cantidad de CB2 en su superficie. Cabe destacarse que los resultados presentados en este trabajo son esperados, con base en los trabajos previos de Heyman y Sparling ^{78,79}, quienes comprobaron que el ejercicio moderado es capaz de inducir un aumento en los niveles de anandamida, endocanabinoide capaz de unirse y activar a ambos CBR. Otros trabajos reportaron que la expresión del RNAm de CBR en células del SI aumenta a la par de la concentración de sus ligandos, si bien esto ha sido mostrado únicamente mediante $\Delta 9$ -THC, *in vivo* e *in vitro* ^{93,94}, su capacidad para activar ambos receptores, sugiere que dicho fenómeno puede trasladarse al uso de anandamida.

A su vez, es necesario remarcar que la actividad física es capaz de afectar diversos sistemas y la liberación de moléculas con diversas funciones, por lo que es prudente tener en cuenta la existencia de otros cambios moleculares que directa o indirectamente sean capaces de modular la expresión de CBR, como el aumento en la concentración de glucocorticoides y catecolaminas consecuencia de la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, la sobre-expresión y liberación de IL10 y el antagonista del receptor a IL1 β , o simplemente el agotamiento de reservorios energéticos (glucosa) ¹¹, todos ellos cambios moleculares que

indirectamente promueven una alteración de la expresión de CBR debido a la polarización de diversas células del SI a un perfil anti-inflamatorio. Por otro lado la señalización por medio de IL's también es capaz de modular la expresión de CBR, llevando acabo tal efecto de manera directa ⁹⁵, como es el caso de la IL4, que es capaz de inducir marcadamente la transcripción de CB1 ⁹⁵.

Como se comentaba previamente, la expresión de CBR en las células del SI varía de acuerdo a la subpoblación celular ^{96,97} así como de su activación ⁸² y polarización a ciertos fenotipos una vez que han sido activadas. De manera clásica el rol de la activación de CBR en el SI ha sido considerado inmuno-supresivo, sin embargo, nueva evidencia sugiere que el CBS funge más una función moduladora, siendo los CBR expresados más intensamente en la superficie de células con un perfil pro-inflamatorio mientras que en fenotipos anti-inflamatorios se expresa con menor abundancia ^{83,85,98}. De esta forma, una mayor expresión de CBR en linfocitos se mostraría en concordancia a la idea de que dichos elementos se hallan más reactivos que sus contrapartes en aquellos animales no ejercitados. En nuestro trabajo, tal fue el caso para las diferentes poblaciones linfocíticas estudiadas: encontrándose incrementada la expresión de CB1 en linfocitos T cooperadores y T $\gamma\delta$, así como CB2 en linfocitos B. Lo que en conjunto con nuestros datos previos, sugiere una inmunidad adaptativa más eficiente ante el reconocimiento de amenazas patogénicas con un debido sistema modulador para apaciguar respuestas exacerbadas o inespecíficas en aquellos animales ejercitados.

Por último, en este trabajo se presentaron variaciones que no pueden ser atribuidas al ejercicio como: la disminución de la población de linfocitos T citotóxicos (CD8+), tanto en el grupo EJER como en el CR, caso similar para la variación en la expresión de CBR en células NK y linfocitos T citotóxicos. En dichos casos, la respuesta inmediata pareciera relacionarse con el efecto crónico del estrés ocasionado por el contexto de ejercitación (debido a la presencia de estas alteraciones en ambos grupos expuestos a la rueda de ejercicio), sin embargo, el análisis de corticosterona dio como resultado la ausencia de variación en los niveles de la hormona. No obstante, debe ser considerada la complejidad de los ejes hipotálamo-pituitario-adrenal y el simpático-adrenal-medular, los cuales desarrollan y modulan finamente las respuestas fisiológicas del estrés, haciendo uso para

ello, de una gran cantidad de moléculas efectoras y receptores ⁹⁹. Por lo que, una consideración mas amplia de estos componentes será necesaria, tomando en cuenta hormonas y catecolaminas (capaces de alterar la producción de ILs a través de NF-κB y AMPc). Además es necesario destacar que la expresión de sus receptores se presenta diferencialmente entre las subpoblaciones celulares del SI, traducándose a su vez, en diferentes sensibilidades hacia sus ligandos efectoros ^{99,100}.

10 CONCLUSIONES

- El ejercicio crónico a una intensidad moderada afecta la composición celular del SI en el bazo de ratas macho:
 - Nuestro modelo de ejercicio disminuye la población de linfocitos T helper.
 - Nuestro modelo de ejercicio disminuye la población de linfocitos B.
 - Nuestro modelo de ejercicio aumenta la población de linfocitos T $\gamma\delta$.
- El ejercicio crónico a una intensidad moderada altera la expresión de los CBR en la superficie de células del SI en el bazo de ratas macho:
 - Nuestro modelo de ejercicio aumenta la expresión de CB1 en células T helper.
 - Nuestro modelo de ejercicio aumenta la expresión de CB1 en células T $\gamma\delta$.
 - Nuestro modelo de ejercicio aumenta la expresión de CB2 en linfocitos B.
- El ejercicio crónico a intensidad moderada aumenta la capacidad proliferativa en células del SI en el bazo de ratas macho.
 - Nuestro modelo de ejercicio incrementa el porcentaje de células NK proliferantes.
 - Nuestro modelo de ejercicio incrementa el porcentaje de linfocitos B proliferantes.
- El ejercicio crónico a intensidad moderada no tienen efecto sobre la actividad citotóxica de células NK.

11 PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha mostrado que un paradigma de ejercicio crónico moderado genera cambios en la composición celular del SI en el bazo de ratas macho, en su funcionamiento, y en la expresión de los CBR en la superficie de algunos de sus componentes celulares. Tales cambios sugieren una adaptación del SI, el cual pudiera repercutir de manera positiva en un escenario donde se presentase un reto inmunológico real, por lo que a continuación planteamos las siguientes perspectivas a seguir dado los datos encontrados en este trabajo:

1. Determinar el efecto que nuestro paradigma de ejercicio tiene sobre la morbilidad y mortalidad ante un modelo de cáncer.
2. Explorar el papel específico del sistema canabinérgico, mediante el uso de agonistas y/o antagonistas canabinérgicos sobre elementos celulares del SI.
3. Determinar los cambios que este paradigma de ejercicio genera en las células del SI en otros tejidos de ratas macho.
4. Explorar los cambios que nuestro paradigma de ejercicio genera en el perfil inflamatorio de las células de SI, mediante la medición y caracterización de sus interleucinas.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Terra, R., Gonçalves da Silva, S. A., Salerno Pinto, V. & Marina, L. D. P. Effects of exercise on the immune system: response, adaptation, and cell signaling. *Exerc. Sport. Med.* **18**, 208–214 (2012).
2. Kylasov, A. & Gavrov, S. *Diversity Of Sport: non-destructive evaluation. Encyclopedia of Life Support Systems* (Elsevier Ltd, 2011).
3. Gomes, E. C., Silva, N. & Oliveira, M. R. De. Oxidants , Antioxidants , and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1–12 (2012).
4. Katch, V. L., McArdle, W. D. & Katch, F. I. *Essentials of Exercise Physiology. Essentials of Exercise Physiology* (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).
5. Thompson, P. D., Crouse, S. F., Goodpaster, B., Kelley, D. & Moyna, N. The acute versus the chronic response to exercise. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **33**, S438–S445 (2001).
6. Handschin, C. & Spiegelman, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. **454**, 463–469 (2008).
7. Gleeson, M. Immune function in sport and exercise. *J. Appl. Physiol.* **103**, 693–9 (2007).
8. Brown, J. C., Winters-Stone, K., Lee, A. & Scmitz, K. H. Cancer, Physical Activity, and Exercise. *Compr Physiol.* **2**, 2775–2809 (2014).
9. Rana, J. S., Li, T. Y., Manson, J. A. E. & Hu, F. B. Adiposity compared with physical inactivity and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* **30**, 53–58 (2007).
10. Scrutinio, D., Bellotto, F., Lagioia, R. & Passantino, A. Physical activity for coronary heart disease: Cardioprotective mechanisms and effects on

- prognosis. *Monaldi Arch. Chest Dis. - Card. Ser.* **64**, 77–87 (2005).
11. Gleeson, M. *et al.* The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 607–615 (2011).
 12. Bruunsgaard, H. & Pedersen, B. K. Effects of exercise on the immune system in the elderly population. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 523–531 (2000).
 13. GROUP, D. P. P. R. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N. Engl. J. Med.* **346**, 393–403 (2002).
 14. Per-Olof, Å., Kaare, R., Hans A, D. & Sigmund B, S. *Testbook of work physiology*. (McGorw Hill, 1997).
 15. Miles, M. P. *et al.* Effects of resistance training on resting immune parameters in women. *Eur. J. Appl. Physiol.* **87**, 506–508 (2002).
 16. Santos, R. V. T., Caperuto, É. C. & Costa Rosa, L. F. B. P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci.* **80**, 573–578 (2006).
 17. Correa, F. *et al.* A role for CB2 receptors in anandamide signalling pathways involved in the regulation of IL-12 and IL-23 in microglial cells. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 86–100 (2009).
 18. Kappel, M. *et al.* Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J. Appl. Physiol.* **70**, 2530–4 (1991).
 19. Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW, A. K. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J. Sports Med. Phys. Fitness* **1**, 1–14 (1990).
 20. Córdova, A., Sureda, A., Tur, J. A. & Pons, A. Immune response to

- exercise in elite sportsmen during the competitive season. *J. Physiol. Biochem.* **66**, 1–6 (2010).
21. Murphy, E. a *et al.* Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **287**, R1354-8 (2004).
 22. Gustafson, M. P. *et al.* A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. *J. Immunother. Cancer* **5**, 1–14 (2017).
 23. Idorn, M. & Hojman, P. Exercise-Dependent Regulation of NK Cells in Cancer Protection. *Trends Mol. Med.* **22**, 565–577 (2016).
 24. Abbas, A. K., Lichtman, An. H. & Pillai, S. *Inmunología celular y molecular.* (Elsevier, 2008).
 25. Owen, A. J. *Kuby. Inmunología.* (2014).
 26. Janeway, C. a & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
 27. Netea, M. G., Quintin, J. & van der Meer, J. W. M. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–61 (2011).
 28. Janeway, C. A. Approaching the Asymptote ? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 1–13 (1989).
 29. David, G. & Katherine, J. *Medicine & Science in Sports & Exercise : Acute exercise effects on the immune system.* **32**, 1–13 (2000).
 30. Freidenreich, D. J. & Volek, J. S. *The Immune Response to Exercise. Nutrition and Enhanced Sports Performance* (Elsevier Inc., 2013).
doi:10.1016/B978-0-12-396454-0.00009-6
 31. Shemesh, R. *et al.* The micro-environmental cross talk between mast cells and lung cancer cells through cell-to-cell contact. *Ann. Oncol.* **30**, 114 (2019).

32. Zhao, S. *et al.* Interleukin 2 regulates the activation of human basophils. *Cytokine* **127**, 154934 (2020).
33. Janeway, C. A. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today* **13**, 11–16 (1992).
34. Gaoni, Y. & Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1646
35. Klein, T. W. *et al.* The cannabinoid system and immune modulation
Abstract : *J. Leukoc. Biol.* **74**, 486–496 (2003).
36. Howlett, A. C. The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **69**, 619–631 (2002).
37. Howlett, A. C. *et al.* International Union of Pharmacology . XXVII .
Classification of Cannabinoid Receptors. **54**, 161–202 (2002).
38. Howlett, A. C. INHIBITION OF NEUROBLASTOMA ADENYLATE
CYCLASE BY CANNABINOID AND NANTRADOL COMPOUNDS.
Life Sci. **35**, 1803–1810 (1984).
39. Howlett, A. C. Cannabinoid Receptor Signaling. *Proteins* 53–79 (2005).
40. Abood, M. E. Molecular biology of cannabinoid receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 81–115 (2005).
41. Pertwee, R. G. Pharmacological actions of cannabinoids. in *Handbook of experimental pharmacology* 1–51 (2005).
42. Klein, T. W., Newton, C. & Friedman, H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol. Today* **19**, 373–81 (1998).
43. Valencia-Sánchez, S., Drucker-Colín, R., Collazo-Navarrete, O., Prospero-García, O. & Morales-Montor, J. Effects of exercise upon immunoregulation: facts and a modern view of its molecular mechanisms. *Advances Neuroimmune Biol.* **7**, 187–198 (2020).
44. Nieman, D. C. Exercise, Infection, and Immunity. *Int. J. Sports Med.* **15**,

- 131–141 (1994).
45. Campbell, J. P., Turner, J. E., Campbell, J. P. & Turner, J. E. Debunking the Myth of Exercise- Induced Immune Suppression : Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. **9**, 1–21 (2018).
 46. Nieman, D. *et al.* Effects_of_high_vs_moderate_intensity_exercise_on.8.pdf. 1126–1134 (1993).
 47. Matthews, C. E. *et al.* Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med. Sci. Sport. Exerc.* **34**, 1242–1248 (2002).
 48. Tiernan, C., Lyons, M., Comyns, T., Nevill, A. M. & Warrington, G. Salivary IgA as a Predictor of Upper Respiratory Tract Infections and Relationship to Training Load in Elite Rugby Union Players. *J. Strength Cond. Res.* **00**, 1 (2019).
 49. Ferreira, C. K. O. *et al.* Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clinics (Sao Paulo)*. **65**, 1167–1173 (2010).
 50. Slusher, A. L., Zúñiga, T. M. & Acevedo, E. O. *Maximal Exercise Alters the Inflammatory Phenotype and Response of Mononuclear Cells. Medicine & Science in Sports & Exercise* (2017).
doi:10.1249/MSS.0000000000001480
 51. Pedersen, B. K. & Hoffman-goetz, L. Exercise and the Immune System : Regulation , Integration , and Adaptation. *Society* **80**, 1055–1081 (2000).
 52. Blannin, a K., Chatwin, L. J., Cave, R. & Gleeson, M. Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocytic activity in middle aged men. *Br. J. Sports Med.* **30**, 125–129

- (1996).
53. Kurokawa, Y., Shinkai, S., Torii, J., Hino, S. & Shek, P. N. Exercise induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocyte subpopulations. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **71**, 245–252 (1995).
 54. Saito, Y., Kusaka, Y. & Shimada, M. Effects of exercise intensity on circulating leukocyte subpopulations. *Environ. Health Prev. Med.* **8**, 18–22 (2003).
 55. Kargotich, S., Keast, D., Goodman, C., Crawford, G. P. M. & Morton, A. R. The influence of blood volume changes on leucocyte and lymphocyte subpopulations in elite swimmers following interval training of varying intensities. *Int. J. Sports Med.* **18**, 373–380 (1997).
 56. Frisina, J. P., Gaudieri, S., Cable, T., Keast, D. & Palmer, T. N. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. *Int. J. Sports Med.* **15**, 36–41 (1994).
 57. Nieman, D. C. *et al.* Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Int. J. Sports Med.* **15**, 199–206 (1994).
 58. Borges, G. F. *et al.* Diferenças em populações de células exterminadoras naturais (Natural Killers-NK) sanguíneas periféricas entre atletas de caiaque e não atletas. *Rev. Bras. Med. do Esporte* **18**, 305–307 (2012).
 59. Gabriel, H., Schwarz, L., Steffens, G. & Kindermann, W. Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int. J. Sports Med.* **13**, 359–66 (1992).
 60. Gannon, G. a, Rhind, S., Shek, P. N. & Shephard, R. J. Naive and memory T cell subsets are differentially mobilized during physical

- stress. *Int J Sport. Med* **23**, 223–229 (2002).
61. Navalta, J. W. *et al.* Exercise intensity and lymphocyte subset apoptosis. *Int. J. Sports Med.* **34**, 268–273 (2013).
 62. Ronsen, O., Pedersen, B. K., Øritsland, T. R., Bahr, R. & Kjeldsen-Kragh, J. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* **91**, 425–434 (2001).
 63. Shimizu, K. *et al.* Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc.Immunol.Rev.* **14**, 24–37 (2008).
 64. Wang, J. *et al.* Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **22**, 643–52 (2012).
 65. Shaw, D. M., Merien, F., Braakhuis, A. & Dulson, D. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine* (2017).
doi:10.1016/j.cyto.2017.10.001
 66. Siedlik, J. A. *et al.* Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain. Behav. Immun.* (2016). doi:10.1016/j.bbi.2016.04.008
 67. Navarro, F. *et al.* Moderate exercise increases the metabolism and immune function of lymphocytes in rats. *Eur. J. Appl. Physiol.* **113**, 1343–1352 (2013).
 68. Lin, Y. S., Jan, M. S. & Chen, H. I. The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. / Effet de l' exercice chronique et aigu sur l' immunite chez des rats. *Int. J. Sports Med.* **14**, 86–92 (1993).
 69. Tossige-Gomes, R. *et al.* Lymphocyte Redox Imbalance and Reduced Proliferation after a Single Session of High Intensity Interval Exercise.

- PLoS One* **11**, e0153647 (2016).
70. Freidenreich, D. J. & Volek, J. S. Immune responses to resistance exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* **18**, 8–41 (2012).
 71. LaVoy, E. C., Bosch, J. A., Lowder, T. W. & Simpson, R. J. Acute aerobic exercise in humans increases cytokine expression in CD27- but not CD27+ CD8+ T-cells. *Brain. Behav. Immun.* **27**, 54–62 (2013).
 72. LaVoy, E. C. *et al.* T-cell redeployment and intracellular cytokine expression following exercise: effects of exercise intensity and cytomegalovirus infection. *Physiol. Rep.* **5**, e13070 (2017).
 73. Syu, G.-D., Chen, H.-I. & Jen, C. J. Differential effects of acute and chronic exercise on human neutrophil functions. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**, 1021–7 (2012).
 74. Pedersen, L. *et al.* Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent. 554–562 (2016).
doi:10.1016/j.cmet.2016.01.011
 75. Elphick, G. F., Wieseler-Frank, J., Greenwood, B. N., Campisi, J. & Fleshner, M. B-1 cell (CD5+/CD11b+) numbers and nIgM levels are elevated in physically active vs. sedentary rats. *J. Appl. Physiol.* **95**, 199–206 (2003).
 76. Vilorio, M. *et al.* Effect of moderate exercise on IgA levels and lymphocyte count in mouse intestine. *Immunol. Invest.* **40**, 640–656 (2011).
 77. Suzuki, K. & Tagami, K. Voluntary wheel-running exercise enhances antigen-specific antibody-producing splenic B cell response and prolongs IgG half-life in the blood. *Eur. J. Appl. Physiol.* **94**, 514–519

- (2005).
78. Heyman, E. *et al.* Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans — Possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 844–851 (2012).
 79. Sparling, P. B., Giuffrida, a, Piomelli, D., Rosskopf, L. & Dietrich, a. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport* **14**, 2209–11 (2003).
 80. Galiègue, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* **61**, 54–61 (1995).
 81. Tanasescu, R. & Constantinescu, C. S. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* **215**, 588–97 (2010).
 82. Cencioni, M. T. *et al.* Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLoS One* **5**, 2–11 (2010).
 83. Malek, N., Popiolek-Barczyk, K., Mika, J., Przewlocka, B. & Starowicz, K. Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures. *Neural Plast.* **2015**, (2015).
 84. Derocq, J., Sagui, M., Marchand, J., Fur, G. Le & Casellas, R. Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *System* **369**, 177–182 (1995).
 85. Chiurchiu, V., Battistini, L. & Maccarrone, M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology* **144**, 352–364 (2015).
 86. Adhikary, S., Kocieda, V. P., Yen, J.-H., Tuma, R. F. & Ganea, D. Signaling through cannabinoid receptor 2 suppresses murine dendritic

cell migration by inhibiting matrix metalloproteinase 9 expression.

Blood **120**, 3741–9 (2012).

87. Massi, P., Fuzio, D., Viganò, D., Sacerdote, P. & Parolaro, D. Relative involvement of cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors in the Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced inhibition of natural killer activity. *Eur. J. Pharmacol.* **387**, 343–7 (2000).
88. Lee, S. F., Newton, C., Widen, R., Friedman, H. & Klein, T. W. Differential expression of cannabinoid CB 2 receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 235–241 (2001).
89. Noe, S. N., Newton, C., Widen, R., Friedman, H. & Klein, T. W. Anti-CD40 , anti-CD3 , and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. **110**, 161–167 (2000).
90. Sugiura, H. *et al.* Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J. Appl. Physiol.* 789–794 (2001).
91. Radom-Aizik, S., Zaldivar, F., Haddad, F. & Cooper, D. M. Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults. *J. Appl. Physiol.* **114**, 628–636 (2013).
92. Lancaster, G. *et al.* Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* **10**, 91–104 (2004).
93. Börner, C., Höllt, V., Sebald, W. & Kraus, J. Transcriptional regulation of the cannabinoid receptor type 1 gene in T cells by cannabinoids. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 336–343 (2007).
94. Nong, L. *et al.* Altered cannabinoid receptor mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from marijuana smokers. *J. od*

- Neuroimmunol.* **127**, 169–176 (2002).
95. Börner, C., Bedini, A., Höllt, V. & Kraus, J. Analysis of Promoter Regions Regulating Basal and Interleukin-4-Inducible Expression of the Human CB1 Receptor Gene in T Lymphocytes. *Mol. Pharmacol.* **73**, 1013–1019 (2008).
 96. Galgglje, S. *et al.* Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Signals* **61**, 54–61 (1995).
 97. Bouaboula, M. *et al.* Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur. J. Biochem.* **214**, 173–180 (1993).
 98. Greineisen, W. E. & Turner, H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 547–55 (2010).
 99. Padgett, D. a. & Glaser, R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* **24**, 444–448 (2003).
 100. Lu, K. D. *et al.* Journal of Clinical and Translational Science
Glucocorticoid receptor expression on circulating leukocytes differs between healthy male and female adults. *J. Clin. Transl. Sci.* **6**, 108–114 (2017).

RESEARCH ARTICLE

Chronic exercise modulates the cellular immunity and its cannabinoid receptors expression

Salvador Valencia-Sánchez¹, Karen Elizabeth Nava-Castro^{2☯}, Margarita Isabel Palacios-Arreola^{1☯}, Oscar Prospéro-García^{3‡}, Jorge Morales-Montor^{1☯4*}, René Drucker-Colín^{1‡‡}

1 Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neuropatología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México,

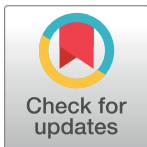
2 Genotoxicología y Mutagénesis Ambientales, Ciencias Ambientales, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Ciudad de México, México, **3** Laboratorio de Cannabinoides, Departamento de Fisiología, Facultad De Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México, **4** Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP, Ciudad de México, México

☯ These authors contributed equally to this work.

‡ Deceased.

‡‡ These authors also contributed equally to this work.

* jmontor66@biomedicas.unam.mx



OPEN ACCESS

Citation: Valencia-Sánchez S, Nava-Castro KE, Palacios-Arreola MI, Prospéro-García O, Morales-Montor J, Drucker-Colín R (2019) Chronic exercise modulates the cellular immunity and its cannabinoid receptors expression. PLoS ONE 14 (11): e0220542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542>

Editor: Junpeng Wang, Henan University, CHINA

Received: July 16, 2019

Accepted: November 1, 2019

Published: November 18, 2019

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542>

Copyright: © 2019 Valencia-Sánchez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by IN-209719 Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación

Abstract

The impact of performing exercise on the immune system presents contrasting effects on health when performed at different intensities. In addition, the consequences of performing chronic exercise have not been sufficiently studied in contrast to the effects of acute bouts of exercise. The purpose of this work was to determine the effect that a popular exercise regimen (chronic/moderate/aerobic exercise) has on the proportion of different immune cell subsets, their function and if it affects the cannabinoid system with potentially functional implications on the immune system. A marked increase in several immune cell subsets and their expression of cannabinoid receptors was expected, as well as an enhanced proliferative and cytotoxic activity by total splenocytes in exercised animals. For this study male Wistar rats performed treadmill running 5 times a week for a period of 10 weeks, at moderate intensity. Our results showed a significant decrease in lymphocyte subpopulations (CD4+, Tγδ, and CD45 RA+ cells) and an increase in the cannabinoid receptors expression in those same cell. Although functional assays did not reveal any variation in total immunoglobulin production or NK cells cytotoxic activity, proliferative capability of total splenocytes increased in trained rats. Our results further support the notion that exercise affects the immunological system and extends the description of underlying mechanisms mediating such effects. Altogether, our results contribute to the understanding of the benefits of exercise on the practitioner's general health.

Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) to JMM; Grant FC-2016-2125 from Fronteras en la Ciencia, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) to JMM; Grant IA202919 Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT), Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) to KENC. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The beneficial impact of exercise on the practitioner's general health is a well-known fact [1–3]. Studies suggesting a connection between physical activity and the improvement of health have generated information that ranges from describing adipose tissue loss to changes in genetic expression [4,5]. It is well known that the proper composition of the immune system (IS) and its correct function will allow it to actively overcome challenges that otherwise would compromise the organism's health, such as infections, autoimmune diseases, cancer, etc. It is worth mentioning that the acknowledgment of those benefits conferred by the regular practice of exercise has led to its implementation as an alternative/complementary therapy against metabolic diseases [6,7], and in recent works even for the treatment of cancer [8].

Nonetheless, data regarding the changes induced by exercise in cell subpopulations of the IS and their function seems to be controversial [9–11]. This may be partly explained by the use of different exercise paradigms. Along with this, a classic idea has been established about such changes promoted by exercise, being those models of moderate/chronic exercise the promoters of an enhanced IS, while acute/high intensity models the responsible of hindering it. Finally, evidence suggesting a beneficial effect of the performance of exercise, on modalities previously described as detrimental, has been gathered and old data reinterpreted as in Campbell and Turner's review [12], so nowadays evidence debunking the previous conception of high intensity/long duration or chronic exercise evoked immune suppression increases, at least for several aspects of the immune function. On the same line, many studies document the immediate changes on the IS induced by a single bout of exercise, as opposed to the effects of its chronic performance, which suggest different outcomes and in some cases opposite effects over the IS [11,13,14]. Less attention has been paid to such studies and to the long-term alterations that it may produce on the IS. For instance, macrophages extracted from mice trained for 12 weeks exhibited increased phagocytic activity, superoxide anion production and glucose consumption when compared to macrophages obtained from sedentary mice [11]. Consistently other studies have shown that chronic exercise alters the function of T cells, affecting their production of pro- and anti-inflammatory cytokines, including the up-regulation of IL-2, an important cytokine related to proliferation and activation [14]. Likewise, trained rats presented increased glucose consumption, IL-2 production and IL-2R expression by their lymphocytic subpopulations. Furthermore, those changes obtained in trained animals seem to last days after the last exercise bout [14].

Many molecular pathways that are affected by exercise possess an immunoregulatory potential, ranging from variations in the energy substrates [15,16] to the activation of signaling pathways with direct immune-regulatory relevance, such as: the release of IL 6 by skeletal muscle [4,13], release of stress hormones, catecholamines [4,17] and neurotransmitters by the sympathetic and para-sympathetic system, among others. Hence, in order to contribute to the further understanding of these effects we decided to evaluate the cannabinergic system (CBS). Regarding this system, some studies have reported a subtle increase of anandamide, a widely studied molecule that acts as a CB1 and CB2 receptor agonist, after short bouts of aerobic exercise. Such increase was sustained up to several minutes after the conclusion of the physical activity [18–20]. Furthermore, both receptors are widely distributed in the immune cells and IS structures [21–23] and when activated, together or independently, produce changes in the function of several immune cells, suggesting that their activation is able to modulate the IS function. These modulatory actions have been explored *in vitro* [24,25] and *in vivo* [23]. Likewise, the expression of cannabinergic receptors (CBR) on the surface of immune cells, varies according to their activation and inflammatory status. Given that new data suggests its relevance as an immune-modulatory system, the expression of these receptors provides us with interesting and relevant information about the IS status.

Altogether, the objective of our study is to explore the long-term changes that chronic exercise (CE) produces in the proportion of splenocytes from the adaptive and innate immunity, and to assess the effects that it has on their function (by performing proliferation tests and cytotoxicity test with total splenocytes *in vitro*), and finally to determine if the expression of CBR in these cells is affected by this model of exercise. Furthermore, coherently with previous works on this topic, we expect that the changes evoked by CE will alter the composition of several of the immune cell subsets studied, mainly those from lymphoid origin. CE will also boost their cytotoxic activity and proliferative capacity. In terms of the cannabinoid receptor expression, we anticipate that CE will increase their expression in the entire cell subsets studied.

Finally, this study provide relevant information about those changes elicited on the IS by a way of exercising chosen by a big proportion of the society nowadays. Besides, our results further support the notion that exercise affects the IS and extends the description of underlying mechanisms mediating such effects.

Materials and methods

Ethic statement

Animal care and experimental practices were conducted at the Animal Facilities of the Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). All procedures in the experimental animals were approved by the Institutional Care and Animal Use Committee (CICUAL), adhering to Mexican regulation (NOM-062-ZOO-1999), in accordance with the recommendations from the National Institute of Health (NIH) of the United States of America (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Euthanasia of experimental animals was performed in a humanitarian way.

Animals

For this study, male Wistar rats ranging between 250 to 300 g were used, proceeding from our own breeding at the animal facilities of IFC, UNAM. The animals were housed at IFC with controlled temperature (22°C) and 12h light-dark cycles, with water and Purina LabDiet 5015 chow *ad libitum* (Purina, St. Louis MO). Sacrifice of those animals used exclusively for flow cytometry or samples extraction for cellular culture, was carried out by cervical dislocation after pentobarbital sodium (Pisabental[®], México) anaesthesia. Animals that also were used for the extraction of the brain were sacrificed by an overdose of pentobarbital sodium (Purina, St. Louis MO). All procedures were carried out in a humanitarian way ensuring the maximisation of efforts in order to alleviate suffering.

Exercise protocol

Animals were set in one of three experimental groups: Exercised (EXE), Treadmill control (TC) and sedentary group (SED). Animals in the exercised group performed treadmill running 5 times a week for a period of 10 weeks, for which a previous habituation of one week was completed. During the habituation week, animals were placed inside the treadmill and then it was turned on at minimum capacity (4m/min) for 5 minutes per day. Once the habituation period was completed, animals started training. On the first day of training, rats ran at 7.5 m/min for 10 minutes, then speed and duration of exercise was escalated gradually each consecutive day, in order to achieve a daily exercise bout of 40 minutes at 15 m/min by the third week. Remaining weeks of training were kept constant in speed and duration until the sacrifice of the animals. It is noteworthy, that this training protocol equals to moderate chronic exercise, as it has been demonstrated in the works by Pilis and Carvalho [26,27] through the calculation

of the velocity at the lactate threshold. No electrical stimulus was used to incentive animals to run inside the treadmill.

Animals sited in the TC group were placed inside the treadmill at minimum capacity (4m/min) for 10 minutes, 5 times per week, for the same period of time than the exercised group (10 weeks). While being inside the treadmill, animals from TC group were exposed to the same context than animals from the EXE group without being exercised, reflecting any effect in the results prompted by sources other than exercise itself. Animals conforming the SED group were kept alive in standard conditions for the same amount of time than the other two groups.

At the end of the training period animals from every group were allowed to rest for one day in order to eliminate any possible effect of acute exercising. Afterwards, animals were sacrificed either by an overdose of pentobarbital sodium or by anesthesia with the same product followed by cervical dislocation (Pisabental[®], México), afterwards the samples were taken.

Flow cytometry

Spleens were manually disaggregated using a 50 μ m nylon mesh, and cells resuspended in PBS. Erythrocytes in the solution were lysed using ACK buffer (150 mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA, pH 7.3) for 10 minutes and washed three times with PBS, then cells were resuspended in FACS buffer (PBS, FBS, 0.02% NaN₃).

Approximately 1x10⁶ cells were incubated with the following antibodies in order to characterize spleen immune subpopulations: Alexa Fluor[®] 488-conjugated- anti rat CD3 (IF4, Biolegend), PE Cy5-conjugated- anti rat CD4 (biolegend), PE-conjugated anti rat CD8a (Biolegend), PE-conjugated -anti rat CD45RA (Biolegend), Alexa Fluor[®] 647-conjugated- anti rat CD161 (biolegend), biotin-conjugated- anti rat CD11b (OX-42, Biolegend), PE-conjugated anti rat TCR (V65, Biolegend). For the determination of macrophages, additionally to the use of anti CD11b antibody, a different gating was used, corresponding to bigger and more complex cells, in order to exclude other cells from the myeloid lineage. Staining of the cell subpopulations was made by duplicate in order to additionally mark on each set one of the cannabinoid receptors.

For the staining of cannabinoid receptors, the polyclonal primary antibodies used were: rabbit anti Cannabinoid receptor I (abcam[®]) and rabbit anti Cannabinoid receptor II (abcam[®]), followed by the Secondary antibodies: AlexaFluor[®] 488- conjugated goat anti rabbit IgG (ThermoFisher Scientific) and DyLight[®] 649- conjugated- anti rabbit IgG (Vector laboratories).

In order to assess proliferation, a Cell Trace™ CFSE cell proliferation kit was used (Invitrogen™). Propidium iodide was used to determine viability of cells during cytotoxic assays. Attune Cytometer (life technologies) was used to obtain data which was further analyzed with FlowJo software (Treestar Inc.).

Proliferation assays

Total splenocytes were obtained as previously described and quantified on a Neubauer chamber. Subsequently, splenocytes were marked with CFSE cell tracer, which was used according to the manufacturer's protocol. Finally, cells were resuspended in RPMI-1640 medium (ATCC[®] 30 2001™). Splenocytes were cultivated in RPMI-1640 medium plus Ionomycin (SIGMA-ALDRICH[®] 10634™) and PMA (SIGMA-ALDRICH[®] P8139-1MG™) at concentrations 100 nm and 25ng/ml for 72 hours. Proliferation was assessed using an Attune cytometer (Life Technologies) with blue and red lasers, obtained data was further analyzed with FlowJo software (Treestar Inc.).

Cell culture

Yac 1 cell line (ATCC[®] - TIB 160[™]) was cultivated in RPMI 1640 medium (ATCC[®] 30–2001[™]) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS, ATCC[®] 30–2020[™]) and kept with air, 95%; carbon dioxide (CO²), 5% at 37°C. Yac 1 cells were expanded for a week then counted on a Neubauer chamber and finally stained with CFSE kit for further use in cytotoxic assays.

In vitro cytotoxic assay

Yac 1 cells were stained with cell trace[™] CFSE kit according to the manufacturer's protocol and used as target cells for the assay. A single cell splenocyte suspension was obtained from rats in the different experimental conditions as previously described, they were counted and used as the effector cells in the assay. Finally both, effector and target cells were co-cultivated in RPMI medium supplemented with 10% FBS for 4 hours, into 96 round well plates. Thereafter co-cultures were removed from the incubator and stained with Propidium Iodide and washed with FACS buffer. Acquisition was performed in an Attune Cytometer (life technologies) and data further analyzed with FlowJo software (Treestar Inc.).

Corticosterone and IgG levels assessment

Animals were anesthetized and sacrificed one day after concluding their experimental condition, at the same time that they had been set for exercising (14:00–16:00 hr.). Cardiac puncture was performed in order to extract blood, which was immediately centrifuged at 4000rpm to collect the blood serum. Subsequently, blood serum was divided into two aliquots and stored at -70°C for later use. Corticosterone levels were assessed with a Corticosterone ELISA kit (Abcam[®] ab-108821) and procedures underwent according to manufacturer's protocol. Assessment of the levels of IgG in serum were carried out on a 96 flat bottom well plate. The plate was previously sensitized with a dilution of blood serum (1:1000), washed and blocked with a 1% albumin solution. Subsequently, the plate was incubated for 2 hours antibodies α IgG rat HRP were incubated, and once incubation finished, several washes were performed, chromogen was added to the wells, the reaction was stopped and the reading of the plate was carried out on a Stat Fax 4200 microplate reader (Awareness Technology).

Statistical analysis

For data regarding the changes of every cell subpopulation, a one-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) was performed followed by a Tukey post-hoc test. Differences were considered significant when $p < 0.05$, with the actual p value and n being stated in each figure legend. Before the selection of the ANOVA test the normal distribution of the data was assessed via Shapiro-Wilk test. A similar process was carried out for the statistical analysis of the data regarding the proliferation and cytotoxicity tests, as well as for the data concerning the levels of corticosterone and IgG in serum. For the assessment of the expression of CBR, a two-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) was performed, because of the consideration of two independent variables (group and CBR), followed by a Bonferroni post-hoc test with the same significant difference criterion. Data from all the experiments were charted as mean \pm standard error, and analysed with Prism 5 software for Mac (GraphPad Software Inc.).

Results

Chronic-moderate exercise affects body composition parameters but not total ingestion of food or water

After ten weeks of rats being exposed to each experimental condition, animals were weighted, and results showed a significant gain of weight on those animals corresponding to both control

groups (SED, 490.8g; TC, 495.8g) against those from the EXE group (452g). ANOVA, $p = 0.0007$, $n = 6$, $P < 0.05$. Accordingly, when samples were extracted, an observable difference in fat accumulation was perceived among the experimental groups, being those animals that performed the physical activity the ones with the lower amount of visceral fat. Interestingly water and food ingestion per week did not change among animals from the different experimental groups ($p = 0.3309$, $n = 6$, $P < 0.05$, and $p = 0.3312$, $n = 6$, $P < 0.05$ respectively).

Chronic-moderate exercise alters the composition of splenocyte subpopulations

Distribution of immune cells is a parameter that provides information about deficiencies or alterations from the IS, therefore we decided to evaluate several cell subpopulations from the innate and adaptive immune system in the spleen of rats that underwent different experimental conditions (S1 Fig). The immune cell subpopulations from the innate immune response that were analyzed corresponded to: NK cells (CD161+) and macrophages (CD11b+) for which flow cytometry analysis did not reflect a significant difference among groups (Fig 1). Analyzed cells from the adaptive immune response were: total T lymphocytes (CD3+), T helper lymphocytes (CD4+), cytotoxic T lymphocytes, T $\gamma\delta$ lymphocytes (T $\gamma\delta$ +) and B lymphocytes (CD45 RA+). For those cells studied, flow cytometry analysis reflected a decrease in the proportion of T helper lymphocytes (Fig 2) and in B lymphocytes (Fig 3) from the EXE group when compared to both control groups, SED and TC (Fig 2 and Fig 3), therefore considering such changes an effect of CE. On the other hand T $\gamma\delta$ lymphocytes showed an increase in the EXE group when compared to SED and TC groups (Fig 2), once more reflecting a change attributable to training. On the other hand, T cytotoxic cells decreased in TC and EXE groups in contrast to SED control group, reflecting an effect non attributable to exercise, but to the exposure to the treadmill (Fig 2). Total T lymphocytes (CD3+), did not show changes among the experimental groups (Fig 2).

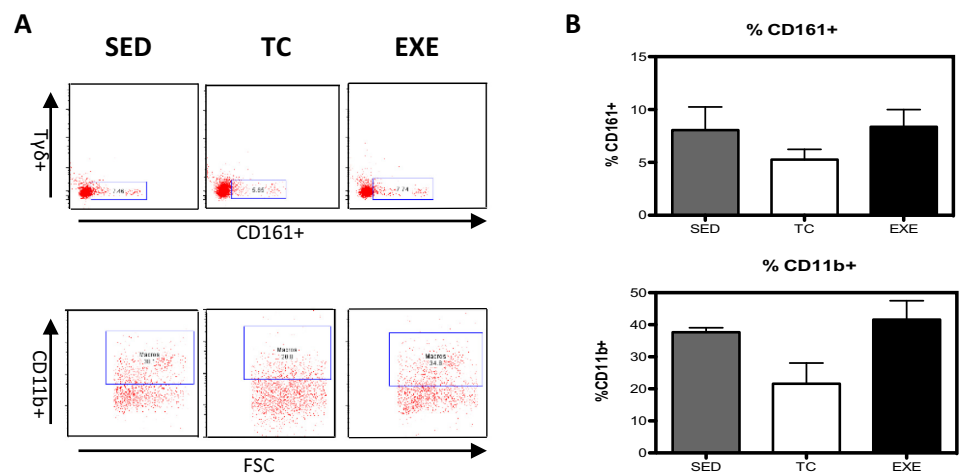


Fig 1. Changes in the composition of splenocyte populations related to the innate immune response. (A) Representative dot plot of the cytometric analysis of the subpopulation percentages. (B) Determination of splenocyte subpopulations from the innate immune response one day after being exposed to each condition in the different groups: SED, TC and EXE; data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. No subpopulation showed statistically significant changes: Natural killer cells (ANOVA, $p = 0.0683$, $n = 10$), and Macrophages (ANOVA, $p = 0.0273$, $n = 10$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g001>

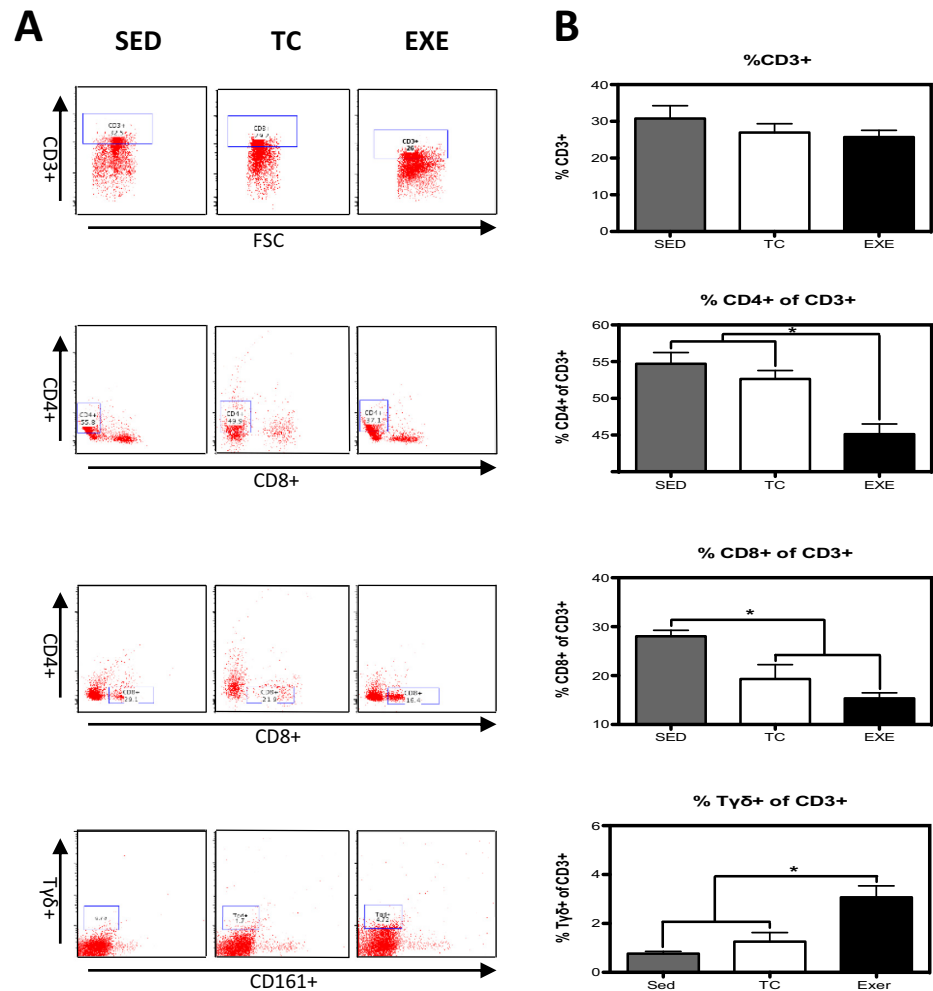


Fig 2. Changes in the composition of splenocyte populations related to the adaptive immune response. (A) Representative dot plot of the cytometric analysis of the subpopulation percentages. (B) Determination of splenocyte populations from the adaptive immune response in the different groups: SED, TC and EXE; data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. Subpopulation that showed statistically significant changes were: T helper lymphocytes (ANOVA, $p = 0.0008$, $n = 5$) and T $\gamma\delta$ lymphocytes (ANOVA, $p = 0.0002$, $n = 10$). T lymphocytes (ANOVA, $p = 0.3739$, $n = 12$), cytotoxic T lymphocytes (ANOVA, $p = 0.0016$, $n = 12$). * Means statistically different from the two other groups, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g002>

Modulation of CBR Expression in splenocytes after chronic exercise

CBR are widely distributed among immune cell subpopulations and structures from the IS. The expression of CBR on immune cells has been demonstrated to vary depending on activation or inflammatory profile, among other parameters. Thus, we decided to evaluate if CE would promote changes in the expression of CBR on splenocytes.

From the innate immune system, NK cells (CD161+) and macrophages were analyzed. NK cells from EXE and TC groups showed a decrease in CB2 expression, compared to SED, while no change was observed in CB1 expression. Macrophages (CD11b+) did not present changes in the expression of any CBR among groups (Fig 4). From the adaptive immune response, T helper lymphocytes (CD4+ cells) presented an increase in the expression of CB1 in animals from EXE group when compared to both control groups SED and TC, while no statistically

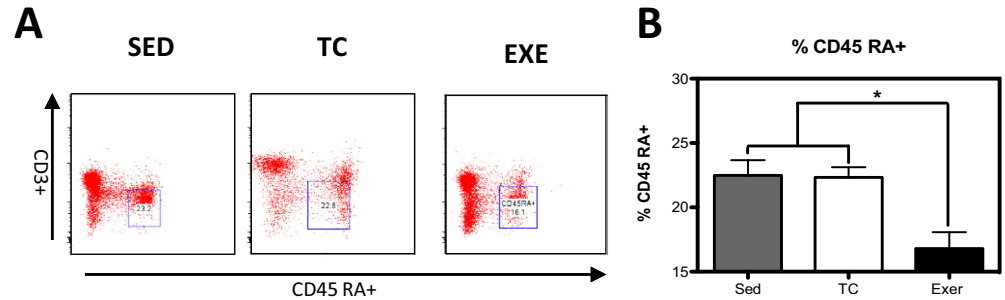


Fig 3. Changes in the composition of B-lymphocytes from spleen. (A) Representative dot plot of the cytometric analysis of the subpopulation percentages. (B) Determination of B-lymphocytes of spleen of rats in the different groups: SED, TC and EXE; data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. B lymphocytes showed a statistically significant change (ANOVA, $p = 0.3601$, $n = 10$). * Means statistically different from the two other groups, $P < 0.05$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g003>

significant difference was observed regarding CB2 expression. A similar phenomenon was observed in $T\gamma\delta$ subpopulation from EXE animals, which showed a higher expression of CB1 when compared to SED and TC groups (Fig 5), with no change in the expression of CB2. The expression of CBR did not vary in the subpopulations of T lymphocytes (CD3+) and cytotoxic T lymphocytes when experimental groups were compared (Fig 5).

On the other hand, B lymphocytes from the spleen of EXE animals showed a significant increase in CB2 expression, compared to those from SED and TC groups, whilst no change was reflected between groups in the expression of CB1 (Fig 6).

Immunoglobulin G levels are not altered by chronic exercising

Immunoglobulin G (IgG) is the most abundant type of immunoglobulins and a reliable parameter to assess the function of plasmatic cells. A change in the amount of IgG could represent an ongoing infectious process or an alteration on the normal function of plasmatic cells when observed in intact animals. We decided to assess if the total production of IgG would vary among our experimental groups. To do so, we performed a direct semi-quantitative ELISA. When data was analyzed statistically (ANOVA, $n = 6$, $p = 0.0676$) results did not show

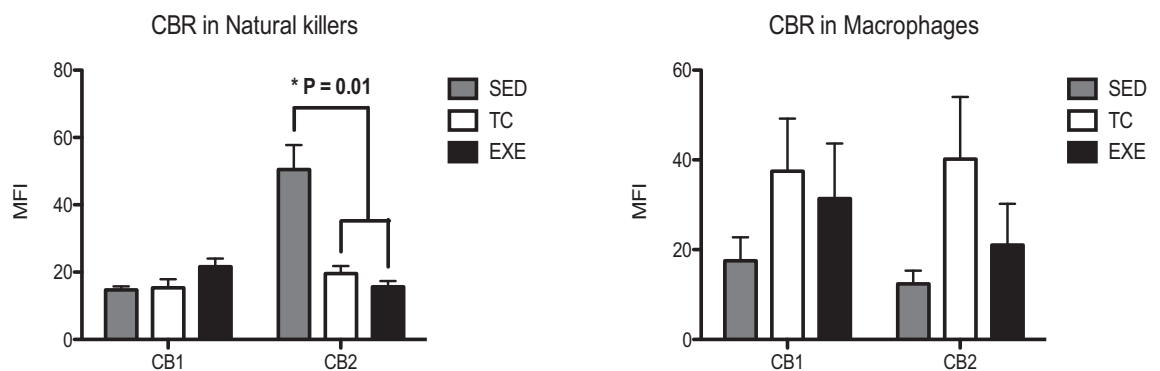


Fig 4. Expression of CBR in splenocyte populations related to the innate immune response. Analysis of the expression of CB1 and CB2 CBR in splenocyte populations from the innate immune response (NK's and macrophages) among experimental groups: SED (shaded bar), TC (white bar) and EXE (Solid bar); data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. Lines connecting bars represent comparison among groups, * $p < 0.05$. Two way ANOVA and Bonferroni post-test, $n = 9$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g004>

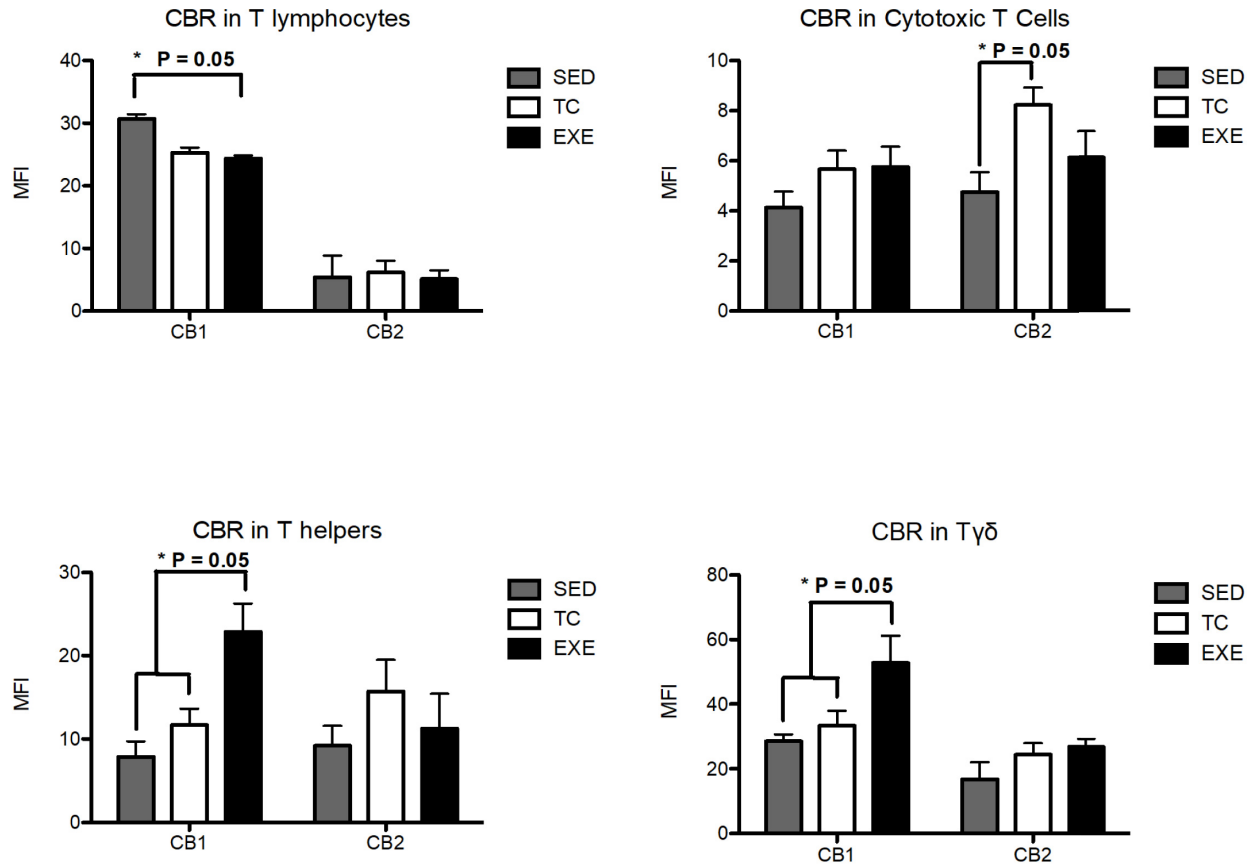


Fig 5. Expression of CBR in splenocyte populations related to the adaptive immune response. Analysis of the expression of CB1 and CB2 CBR in splenocyte populations from the adaptive immune response (T lymphocytes; n = 10, T helper lymphocytes; n = 8, cytotoxic T Lymphocytes; n = 10 and T $\gamma\delta$ n = 8) among experimental groups: SED (shaded bar), TC (white bar) and EXE (Solid bar); data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. Lines connecting bars represent comparison among groups, * p<0.05. Two way ANOVA and Bonferroni post-test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g005>

any significant difference among the experimental groups: SED (optic density 2.731), TC and EXE (OD 2.973 and 2.871 respectively, [S2 Fig](#)).

Chronic exercise enhances proliferative capacity but not cytotoxic activity of total splenocytes

Proliferative capacity and cytotoxic activity have been tested before in order to assess the degree of competence of a subject's immune system. In order to observe if chronic exercise has any effect on both features we performed *in vitro* tests. For the proliferation assay we obtained total splenocytes and cultivated them on complete RPMI medium plus PMA and ionomycin for 72 hours. Data analyzed reflected no difference among groups in their proliferation index ([Fig 7B](#)). Nevertheless, total splenocytes from EXE group showed a higher proportion of dividing cells when compared to SED and TC groups ([Fig 7C](#)). Furthermore, we decided to test the proliferative capacity of the immune cell subpopulations and we found that B lymphocytes and NK cells from the EXE group exhibited a higher proportion of dividing cells than both SED and TC groups ([Fig 7D](#)).

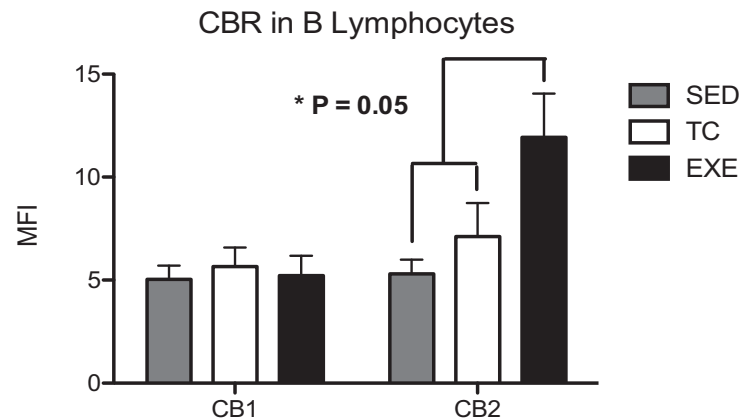


Fig 6. Expression of CBR in B lymphocytes from spleen. Analysis of the expression of CB1 and CB2 CBR in B lymphocytes from spleen among experimental groups: SED (shaded bar), TC (white bar) and EXE (Solid bar); data from 4 independent experiments are expressed as mean \pm SE. Lines connecting bars represent comparison among groups, * $p < 0.05$. Two way ANOVA and Bonferroni post-test, $n = 10$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g006>

In order to measure the cytotoxic capacity of splenocytes from the different groups, we performed a cytotoxicity test utilizing Yac1 cells as target cells and cultivating them with total splenocytes from animals of the different groups. Yac1 cells were previously marked with CFSE, and at the end of the test dead cells were dyed with propidium iodide, so double positive cells represented the target cells killed. The assay was carried out at three different effector/target ratios: 10:1, 50:1 and 100:1 and none showed any significant difference among treatments after the statistical analysis (Fig 8).

Corticosterone level is not altered by chronic exercise

Corticosterone level is considered a reliable stress marker in animals. In order to further comprehend the data obtained, we decided to analyze if corticosterone levels of blood serum differ among groups, reflecting a possible long-term effect of stress in exercised animals. When data was statistically analyzed (ANOVA, $n = 6$, $p = 0.0473$, Tukey's) results show a significant difference among the experimental groups. Nonetheless, The post hoc analysis did not show any significant interaction among the experimental groups. Means of the groups: TC and EXE (102.6 and 96.5 ng/ml respectively) were notoriously higher than that of the SED group (46.8 ng/ml, S3 Fig).

Discussion

Although widely studied, the consequences of physical activity over the IS remain as a promising field not only to expand our comprehension on basic physiology, but also on physiopathology and the different processes that take part on the orchestration of the immune response. At first instance, our investigation tries to emulate in rats a popular paradigm of exercising in modern times across the global population, which involves the chronic performance of medium intensity aerobic exercise. Such particularities in our model have led us to assess its raw impact over the IS composition and its function. Notwithstanding, the vast majority of studies have focused in the effects of short bouts of exercise over the immediate changes in composition and function of the IS [1,11,28,29], and neglecting those focused on the effect of CE and its long lasting effects over the IS [13,30]. In this study we observed that components

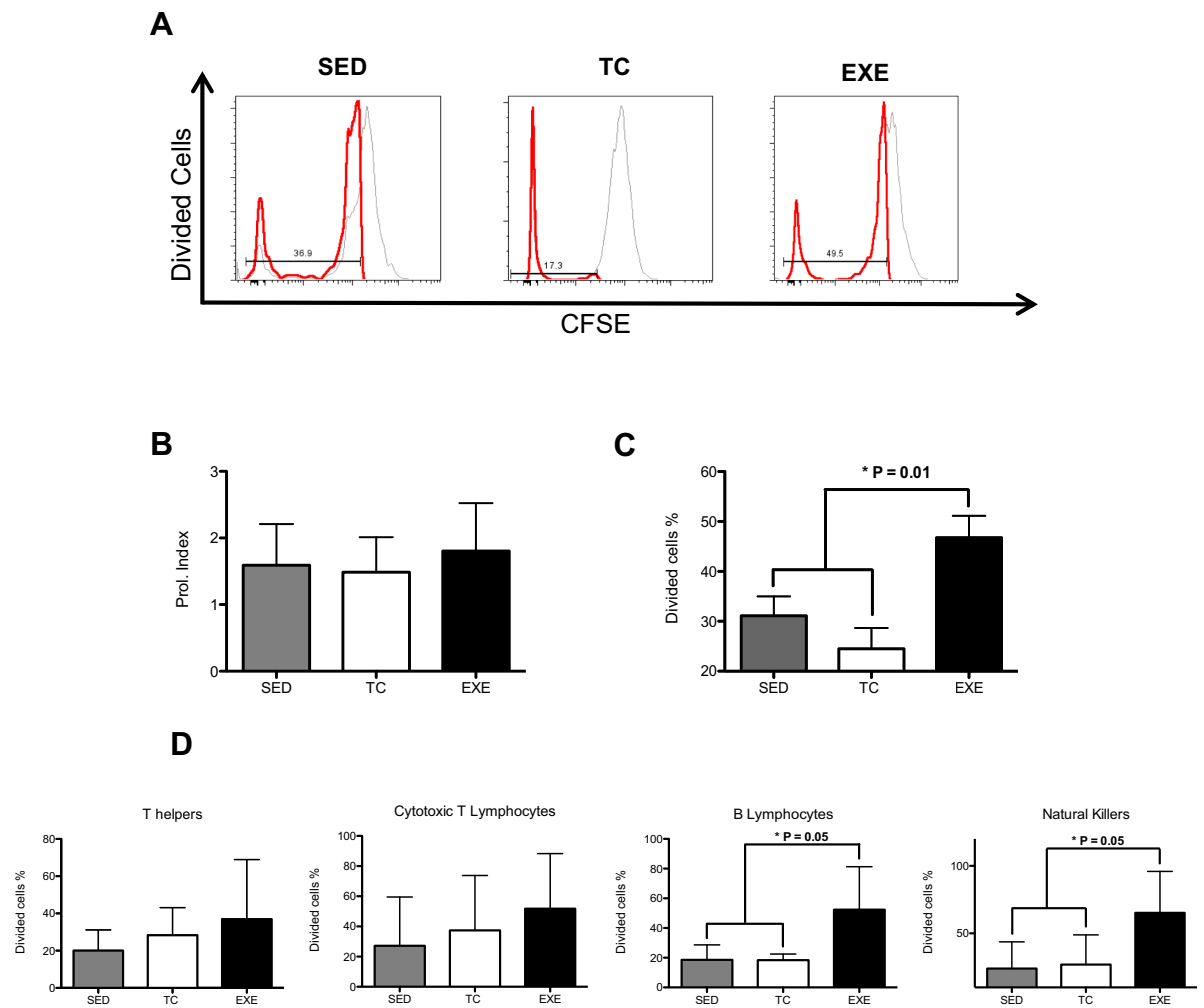


Fig 7. Effect of chronic exercise on splenocyte proliferation. (A) Representative histograms of cytometric analysis of dividing cells. Two parameters were considered to assess the proliferative capacity of splenocytes: (B) the proliferation index, which did not change due to chronic exercise and (C) the proportion of dividing cells, where we observed an increase in the exercised group when compared to both control groups (ANOVA, $p = 0.0092$, $n = 5$). (D) Analysis of proliferative capacity of specific splenocyte subpopulations: T helper lymphocytes (ANOVA, $p = 0.4543$, $n = 5$) and cytotoxic T lymphocytes (ANOVA, $p = 0.5248$, $n = 6$) did not show any change between groups; B lymphocytes (ANOVA, $p = 0.0006$, $n = 6$) and Natural killers (ANOVA, $p = 0.0191$, $n = 6$) from EXE did show an increase in the proportion of dividing cells when compared to both control groups. In graphic bars SED is represented by shaded bar, TC by white bar and EXE by the solid bar.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g007>

from the innate immune response were not affected by chronic-moderate exercise, while elements from the adaptive immune response did change in those animals that underwent physical training. T helper lymphocytes and B lymphocytes were decreased in trained animals, contrary to what would be expected according to the popular statement of moderate exercise enhancing a pro-inflammatory state [31,32]. On the other hand, $T\gamma\delta$ lymphocytes increased in animals from the EXE group, increase that could reflect an intensification in surveillance and protection of the upper respiratory tracts (URT) and mucosa tissue, idea that would be in accordance with the strengthened resistance against URT infections due to moderate exercising and opposite to the supposed effect of higher susceptibility to these infections in high performance athletes [29,33–37]. Nonetheless, the reduction of T helper and B lymphocyte populations was unexpected, since these cells play a major role at recognizing antigens and

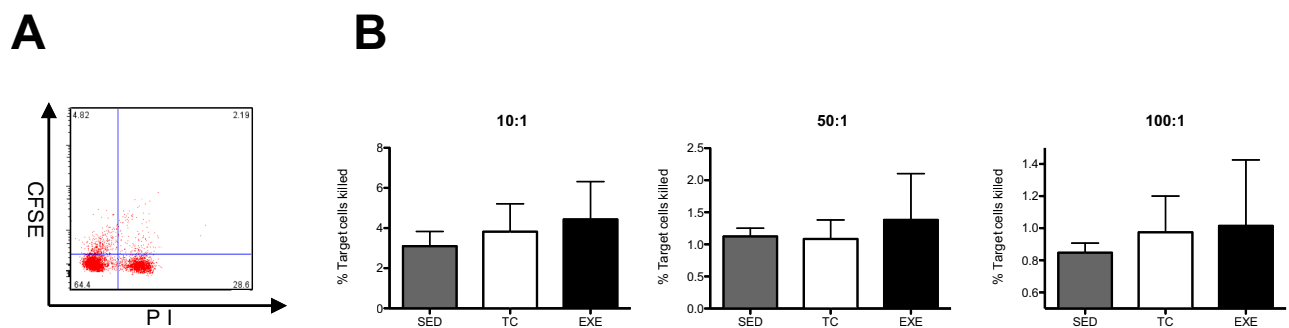


Fig 8. Cytotoxic activity of total splenocytes in vitro. (A) Representative dot plot of cytometric analysis of killed target cells percentage. (B) Cytotoxic activity of total splenocytes was assessed in vitro at three different ratios (effector cells: target cells, 10:1, 50:1 and 100:1); data from 2 independent experiments are expressed as mean \pm SE, with an $n = 6$ for each condition. No differences were found among the groups at any of the different ratios. In bar graphics SED is represented by the shaded bar, TC by the white bar and EXE by the solid bar.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220542.g008>

therefore at orchestrating immune responses against new and already known threats and once activated they can polarize towards a pro-inflammatory or anti-inflammatory state which modulates the activity of several other components from the innate and adaptive immune response. Consequently, the decrease of T helper lymphocytes as well as that of B lymphocytes made us wonder if it could be translated into a deficient immune response of animals of the EXE group.

Once we determined that our exercising paradigm did affect the composition of immune cells subpopulations, our next goal became to assess if those changes would be translated into functional alterations. To accomplish our purpose, we determined total IgG in serum among experimental groups and we also performed proliferation and cytotoxicity test *in vitro*. On the proliferation test, two parameters were evaluated: the proliferation index and the percentage of dividing cells. The first represents the mean of divisions that dividing cells underwent during the assay, which showed no difference among groups. In turn, the percentage of dividing cells among groups during the experiment showed statistical differences, being higher in splenocytes from the EXE group. Altogether, this data suggests that cells from EXE group are not more efficient at dividing once they have been activated but that more cells in proportion from EXE group are prone to proliferate once they have been exposed to PMA and ionomycin. These results made us wonder if this trend would be persistent in basal conditions, so we compared the percentage of proliferation in splenocytes among the experimental groups without activation by PMA and ionomycin and the statistical analysis showed no difference among them, reflecting a response produced by activation and not an anomaly that could reflect an inflammatory state that in turn could favor an autoimmune response. Thereafter, we evaluated the percentage of dividing cells from specific subpopulations, T helper cells, cytotoxic T cells, B lymphocytes and NK cells, showing an increase in the percentage of dividing cells in the last two subpopulations by effect of exercise. On the other hand, statistical analysis from the cytotoxicity test did not show variation among the experimental groups in any of the target/effector cell ratios tested, so data provided from this experiment does not suggest a higher cytotoxic activity from NK cells as a consequence from exercise. Nonetheless, exercise enhances the amount of NK cells that proliferate, which may indicate a higher immune-surveillance against transformed and virally infected cells in chronically exercised subjects.

Even though we found a decrease in major lymphocyte subpopulations (CD4⁺ and CD45 RA⁺ cells), which has been reported before for other immune cells in long term exercised individuals [32,38–40], we also determined that a bigger proportion of splenocytes is prone to

activate when stimulated, plus other functions of splenocytes from the EXE animals were not impaired. Given the fact that long-term exercised subjects do not report any kind of immune suppression, we have come to hypothesize that the decrease in the composition of some cell subpopulations may represent a more efficient IS, which requires less elements but presents a stronger reaction when needed. This idea is also supported by the results shown by the ELISA test, which showed that levels of IgG did not change among the groups, even though the subpopulation of B lymphocytes is decreased in EXE animals.

Finally, recent works have denominated the endocannabinoid system (ECS) as an immunomodulatory system; inhibiting the function of highly reactive and pro-inflammatory cells [25,41,42]. The ECS exerts its functions through the activation of its receptors, which expression vary greatly depending on cell subpopulation, activation or inflammatory status [24,41,43,44], being increased in the surface of more reactive cells. In this work we demonstrated that CE promotes changes in the expression of both CBR's in splenocytes, through the staining of each receptor on different cell suspension aliquots and due to the shared epitope for the secondary antibody. Our findings concur with previous works showing that during moderate exercise bouts there is an increase of circulating ECS agonists [18,19]. We must emphasize that changes in CBR's expression remained after one skipped day of training, which suggests that subjects exercising on a daily basis or in intervals of every two days might be maintaining this alterations. Our methodology allowed us to determine differences in the expression of CBR among cell subpopulations even between control groups. These differences might be explained by the intrinsic variability among cell subpopulations [21,45]. We also assessed an increased expression of CB1 receptor in the subpopulations of T helper and $T\gamma\delta$ lymphocytes and an increase in the expression of CB2 receptor in B lymphocytes of exercised animals. Therefore enhanced expression of CB1 in T helper, $T\gamma\delta$, and CB2 in B lymphocytes could represent a mechanism to down regulate the activity of these probable high metabolic cells from EXE animals, as reflected by the proliferation tests. Some of these data differ from anterior reports concerning expression of CBR, nonetheless most of those reports used different techniques and did not measure the protein conforming CBR's but mostly mRNA [21,46,47], which highlights the novelty of the data presented in this work, by showing a direct measure of the expressed protein in question under this particularly conditions of exercise. On the same line, the increased expression of CBR in splenocytes, particularly in lymphocytes from the EXE group, concurs with previous data reporting changes in the expression of the protein through the assessment by different techniques, like western blot and immunofluorescence [21,48,49], adding validity to our results.

We would like to address those changes presented on this work that can not be attributable to CE, like the composition of cytotoxic T cells for which TC and EXE groups differ when compared against SED group, reflecting an effect relying probably on the stress produced by the placement of the animals inside the treadmill, being that, the one thing that those groups had in common. The same explanation seems plausible for the expression of CBR in NK and cytotoxic T cells. Nevertheless analysis of corticosterone did not showed significant difference among the experimental groups, different sensitivity to several molecules has been reported for the wide variety of cells from the IS, leaving the possibility of other molecular interactions that escaped our control and awareness.

Supporting information

S1 Fig. Gating strategy for the flow cytometric analysis of rat spleen subpopulations and their expression of CB1 and CB2 receptors. Single cell suspension was prepared and stained with fluorochrome-conjugated antibodies to separate splenocyte subpopulations and to mark

cannabinoid receptors (CB1 and CB2). Data was analyzed with FlowJo software 8.7 for Mac. Lymphocytes were identified by their scatter properties (FSC-A x SSC-A plot). Splenocyte subpopulations were characterized by surface staining and gated for their quantity assessment. Subsequently each cellular subpopulation was analyzed for their expression of both cannabinoid receptors in their surface.

(TIFF)

S2 Fig. Levels of IgG are not affected by chronic exercise. The analysis of total IgG was assessed for every experimental group with the use of a direct semi-quantitative ELISA. Statistical analysis did not show any significant difference among the experimental groups: SED (shaded bar), TC (white bar) and EXE (Solid bar). $P > 0.05$. ANOVA, $p = 0.0676$, $n = 6$.

(TIF)

S3 Fig. Serum corticosterone concentration one day after the last exercising bout. Data is shown as mean (ng/ml) \pm SE for each group. There was no significant difference among group values in concentration of serum corticosterone. Groups analyzed: SED (shaded bar), TC (white bar) and EXE (Solid bar). When data was statistically analyzed (ANOVA, $n = 6$, $p = 0.0473$, Tukey's) results show a significant difference among the experimental groups. Nonetheless, The post hoc analysis did not show any significant interaction among the experimental groups. Means of the groups: TC and EXE (102.6 and 96.5 ng/ml respectively) were notoriously higher than that of the SED group (46.8 ng/ml).

(TIF)

Acknowledgments

We thank M.V.Z Claudia Rivera-Cerecedo and her animal facility staff for assisting in the breeding of experimental animals. We also thank Diana Millán-Aldaco and Marcela Palomero-Rivero for their technical support.

Salvador Valencia-Sánchez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 223625 from CONACYT.

Author Contributions

Conceptualization: Salvador Valencia-Sánchez, Karen Elizabeth Nava-Castro, Oscar Prospero-García, Jorge Morales-Montor, René Drucker-Colín.

Data curation: Karen Elizabeth Nava-Castro.

Formal analysis: Salvador Valencia-Sánchez, Karen Elizabeth Nava-Castro, Margarita Isabel Palacios-Arreola, Oscar Prospero-García, Jorge Morales-Montor.

Funding acquisition: Karen Elizabeth Nava-Castro, Jorge Morales-Montor, René Drucker-Colín.

Investigation: Salvador Valencia-Sánchez, Margarita Isabel Palacios-Arreola, Oscar Prospero-García, Jorge Morales-Montor.

Methodology: Salvador Valencia-Sánchez, Margarita Isabel Palacios-Arreola.

Project administration: Jorge Morales-Montor, René Drucker-Colín.

Resources: Oscar Prospero-García, Jorge Morales-Montor.

Writing – original draft: Karen Elizabeth Nava-Castro, Margarita Isabel Palacios-Arreola, Oscar Prospéro-García, Jorge Morales-Montor, René Drucker-Colín.

Writing – review & editing: Jorge Morales-Montor.

References

1. Santos RVT, Caperuto É C, Costa Rosa LFBP. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci.* 2007; 80(6):573–8. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.10.015> PMID: 17123550
2. Freidenreich DJ, Volek JS. Immune responses to resistance exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2012; 18:8–41. PMID: 22876721
3. Freidenreich DJ, Volek JS. The Immune Response to Exercise [Internet]. *Nutrition and Enhanced Sports Performance*. Elsevier Inc.; 2013. 95–101 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123964540000096>
4. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Sep 5; 11(9):607–15. Available from: <https://doi.org/10.1038/nri3041> PMID: 21818123
5. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK β and ER stress inhibition. *PLoS Biol.* 2010; 8(8):31–2.
6. Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. 2008; 454(7203):463–9. <https://doi.org/10.1038/nature07206> PMID: 18650917
7. GROUP DPPR. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Feb 7; 346(6):393–403. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512> PMID: 11832527
8. Gustafson MP, DiCostanzo AC, Wheatley CM, Kim CH, Bornschlegl S, Gastineau DA, et al. A systems biology approach to investigating the influence of exercise and fitness on the composition of leukocytes in peripheral blood. *J Immunother Cancer.* 2017; 5(1):1–14.
9. LaVoy EC, Hussain M, Reed J, Kunz H, Pistillo M, Bigley AB, et al. T-cell redeployment and intracellular cytokine expression following exercise: effects of exercise intensity and cytomegalovirus infection. *Physiol Rep* [Internet]. 2017; 5(1):e13070. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087817%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5256156%5Cnhttp://physreports.physiology.org/lookup/doi/10.14814/phy2.13070> PMID: 28087817
10. Pedersen BK, Hoffman-goetz L. *Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation*. Society. 2000; 80(3):1055–81.
11. Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol.* 2001;789–94.
12. Campbell JP, Turner JE, Campbell JP, Turner JE. Debunking the Myth of Exercise- Induced Immune Suppression: Redefining the Impact of Exercise on Immunological Health Across the Lifespan. 2018; 9 (April):1–21.
13. Lancaster G, Halson S, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, et al. Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* [Internet]. 2004; 10:91–104. Available from: http://www.researchgate.net/publication/8096824_Effects_of_acute_exhaustive_exercise_and_chronic_exercise_training_on_type_1_and_type_2_T_lymphocytes/file/79e4150c59a6b1619f.pdf PMID: 15633589
14. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports* [Internet]. 2012 Oct [cited 2012 Oct 10]; 22(5):643–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410542> <https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2010.01288.x> PMID: 21410542
15. Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, Singh A, Crowe SM. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine* [Internet]. 2016 Apr; 6:31–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.012> PMID: 27211546
16. Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, Christian N, Crowe SM. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol.* 2015; 6(JAN):1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00001> PMID: 25657648

17. Padgett D a, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 2003; 24(8):444–8. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00173-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00173-x) PMID: 12909458
18. Sparling PB, Giuffrida a, Piomelli D, Roszkopf L, Dietrich a. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport* [Internet]. 2003 Dec 2 [cited 2012 Aug 22]; 14(17):2209–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625449> <https://doi.org/10.1097/00001756-200312020-00015> PMID: 14625449
19. Heyman E, Gamelin F, Goekint M, Piscitelli F, Roelands B, Leclair E, et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans—Possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology.* 2012; 37:844–51. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.09.017> PMID: 22029953
20. Galdino G, Romero TRL, Silva JFP, Aguiar DC, De Paula AM, Cruz JS, et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology* [Internet]. 2014; 77:313–24. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.022> PMID: 24148812
21. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrikre D, Camyon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 1995; 61(232):54–61.
22. Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* [Internet]. 1998 Aug; 19(8):373–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21873455> [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(98\)01300-0](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(98)01300-0) PMID: 9709506
23. Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* [Internet]. 2010 Aug [cited 2012 Jul 23]; 215(8):588–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153077> <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.12.005> PMID: 20153077
24. Cencioni MT, Chiurchiù V, Catanzaro G, Borsellino G, Bernardi G, Battistini L, et al. Anandamide suppresses proliferation and cytokine release from primary human T-lymphocytes mainly via CB2 receptors. *PLoS One.* 2010; 5(1):2–11.
25. Malek N, Popiolek-Barczyk K, Mika J, Przewlocka B, Starowicz K. Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures. *Neural Plast.* 2015; 2015.
26. Pilis W., Zarzeźny R., Langfort J., Kactuba-Uscitko H., Nazar K., Wojtyna J. Anaerobic threshold in rats. *Comp Biochem Physiol.* 1993;(106):285–9.
27. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. 2005; 140:409–13. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.12.002> PMID: 15936699
28. Radom-Aizik S, Zaldivar F, Haddad F, Cooper DM. Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults. *J Appl Physiol* [Internet]. 2013; 114(5):628–36. Available from: <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01341.2012> PMID: 23288554
29. Murphy E a, Davis JM, Brown a S, Carmichael MD, Van Rooijen N, Ghaffar a, et al. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004; 287(6):R1354–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308485> <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00274.2004> PMID: 15308485
30. Syu G-D, Chen H-I, Jen C-J. Differential effects of acute and chronic exercise on human neutrophil functions. *Med Sci Sports Exerc* [Internet]. 2012; 44(6):1021–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130467> <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3182408639> PMID: 22130467
31. Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol.* 2012;789–94.
32. Saito Y, Kusaka Y, Shimada M. Effects of exercise intensity on circulating leukocyte subpopulations. *Environ Health Prev Med* [Internet]. 2003; 8(1):18–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2723261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <https://doi.org/10.1007/BF02897939> PMID: 21432111
33. Davis JM, Murphy E a, Brown a S, Carmichael MD, Ghaffar a, Mayer EP. Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on innate immune function and susceptibility to respiratory infection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286(2):R366–72. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00304.2003> PMID: 14551169
34. Slusher AL, Zúñiga TM, Acevedo EO. Maximal Exercise Alters the Inflammatory Phenotype and Response of Mononuclear Cells [Internet]. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 2017. 1 p. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005768-900000000-97070>
35. Matthews CE, Ockene IR a S, Freedson PS, Rosal MC, Merriam P a, Hebert JR. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sport Exerc.* 2002; 34(8):1242–8.

36. Parsons LM, Denton D, Egan G, Mckinley M, Shade R, Lancaster J, et al. Neuroimaging evidence implicating cerebellum in support of sensorycognitive processes associated with thirst. 2000; 97(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.040555497> PMID: 10688891
37. MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2000 Oct; 78(5):502–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050533> <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2000.t01-7-.x> PMID: 11050533
38. Córdova A, Sureda A, Tur JA, Pons A. Immune response to exercise in elite sportsmen during the competitive season. *J Physiol Biochem* [Internet]. 2010 Mar 29; 66(1):1–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13105-010-0001-2> <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0001-2> PMID: 20428993
39. Lin YS, Jan MS, Chen HI. The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. / Effet de l' 'exercice chronique et aigu sur l' 'immunite chez des rats. *Int J Sports Med* [Internet]. 1993; 14(2):86–92. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=sph&AN=SPH360924&site=ehost-live> <https://doi.org/10.1055/s-2007-1021151> PMID: 8463030
40. Blannin a K, Chatwin LJ, Cave R, Gleeson M. Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocytic activity in middle aged men. *Br J Sports Med* [Internet]. 1996 Jun 1; 30(2):125–9. Available from: <http://bjsm.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjrm.30.2.125> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1332375&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <https://doi.org/10.1136/bjrm.30.2.125> PMID: 8799596
41. Chiurchiu V, Battistini L, Maccarrone M. Endocannabinoid signalling in innate and adaptive immunity. *Immunology*. 2015; 144(3):352–64. <https://doi.org/10.1111/imm.12441> PMID: 25585882
42. Greineisen WE, Turner H. Immunoactive effects of cannabinoids: considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2010 May [cited 2013 Mar 7]; 10(5):547–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219697> <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.02.012> PMID: 20219697
43. Galgglje S, Mary S, Marchand J, Dussosoy D, Carrikre D, Camyon P, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Signals*. 1995; 61:54–61.
44. Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *Eur J Biochem* [Internet]. 1993; 214(1):173–80. Available from: <http://content.febsjournal.org/cgi/content/abstract/214/1/173> <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17910.x/full> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8508790> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed> <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17910.x> PMID: 8508790
45. Graham ES, Angel CE, Schwarcz LE, Dunbar PR, Glass M. Detailed characterisation of CB2 receptor protein expression in peripheral blood immune cells from healthy human volunteers using flow cytometry. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010; 23(1):25–34. <https://doi.org/10.1177/039463201002300103> PMID: 20377992
46. Lee SF, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW. Differential expression of cannabinoid CB 2 receptor mRNA in mouse immune cell subpopulations and following B cell stimulation. *Eur J Pharmacol*. 2001; 235–41.
47. Noe SN, Newton C, Widen R, Friedman H, Klein TW. Anti-CD40, anti-CD3, and IL-2 stimulation induce contrasting changes in CB1 mRNA expression in mouse splenocytes. 2000; 110:161–7. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00349-0](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00349-0) PMID: 11024546
48. Amancio-Belmont O, Becerril Meléndez AL, Ruiz-Contreras AE, Méndez-Díaz M, Prospéro-García O. Opposed cannabinoid 1 receptor (CB1R) expression in the prefrontal cortex vs. nucleus accumbens is associated with alcohol consumption in male rats. *Brain Res* [Internet]. 2019; 1725(September):146485. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146485> PMID: 31568767
49. Piszcz J a, Lemancewicz D, Kloczko J, Dzieciol J, Rusak M, Dabrowska M. Cannabinoid receptors expression in bone marrow trephine biopsy of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with purine analogues. *Exp Oncol* [Internet]. 2007 Sep; 29(3):221–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18004250> PMID: 18004250

Review

Effects of Exercise upon Immunoregulation: Facts and a Modern View of its Molecular Mechanisms

Salvador Valencia-Sánchez^a, René Drucker-Colín^{a,†,*}, Omar Collazo-Navarrete^d, Oscar Prospero-García^b and Jorge Morales-Montor^{c,*}

^a*Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito exterior S/N, Ciudad Universitaria, CDMX, México*

^b*Departamento de Fisiología, Laboratorio de Canabinoides, Facultad De Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México*

^c*Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, CDMX, México*

^d*Laboratorio Nacional de Recursos Genómicos (LaNReGen), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México*

Abstract. The relationship between exercise and the immune system (IS) is a subject that has had widespread attention across time. Both types of behavior, lack of exercise/exhausting exercise, are suggested to weaken immunity. On the contrary, regular moderate exercise seems to boost it. The effects of exercise over the immune responses must be well determined in order to understand how lack of exercise increases the susceptibility to viral, bacterial, and parasitic infections. Nonetheless, we must keep in mind that the relation between physical activity and health is not as direct as it seems, for instance, greater susceptibility to infections after strenuous exercise bouts has been reported, and no impact at all over the immune system is reported during and after low-intensity bouts. Some of the parameters from the immune system that are affected when exercise is performed to exhaustion are: levels of salivary IgA, impaired mitogenic proliferation of lymphocytes, decreased HLA-DR expression, up-regulation of CD14+ cells, variations in CD4+ and CD8+ T lymphocytes proportion, among others. This review discusses the evidence of the effects that exercise elicits on the immune response on different conditions, presenting an updated view about it. Furthermore, we will underline the evidence about the different effects provoked by exercise when performed at distinct intensities and durations. Finally, we will focus on the molecular mechanisms that offer substrate to these interactions and how they help us understand it.

Keywords: Exercise, metabolism, immunomodulation, physiology

INTRODUCTION

The relationship between exercise and the immune system (IS) has been amply studied across time. It has long been suggested that physical activity brings benefits to health in general. However, the mechanisms that allow exercise to impact on the immune system have not been sufficiently studied [1].

Furthermore, it has been consistently demonstrated that exercise can affect the components of the IS in terms of the cellular proportions found in the

[†]Deceased.

*Correspondence to: Jorge Morales-Montor, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, CDMX, México. E-mail: jmontor66@biomedicas.unam.mx; and René Drucker-Colín, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Circuito exterior S/N, Ciudad Universitaria, CDMX, México.

circulating blood and in the so-called, marginal pools [2–6]. Moreover, exercise alters the IS activity, either by boosting or hindering it, and an acceptable explanation to this dual and apparently incongruent phenomenon seems to relay on the exercise intensity and chronicity. Even though there are many researches focused on this topic, the parameters to delimit the exercise intensity are not clear enough, usually relying on heart rate or the maximal oxygen consumption (VO₂ Max.), and the classification of intensities varying among experiments. Thereafter, in this review we will show the parameters considered by the authors of some works for determining the different intensities on their own experimental model.

Remarkably, high-intensity exercise, as well as sedentary behavior, affects negatively the function of the IS, nonetheless, in this review, we will focus only in the effects of physical activity.

Some of the changes induced by high-intensity exercise are reflected as: a decreased lymphocyte proliferation, decreased cytotoxic activity by Natural Killer cells (NK), and reduced B cells antibody production. Furthermore, exhausting exercise bouts have also been related to an increased susceptibility to acquire infections [7, 8], in contrast to non-exhausting/moderate exercise, which causes the opposite effect [9].

To date, several authors have tried to untangle the complexity of this topic by enumerating the multiple factors taking part in the immunoregulation by exercise, but so far with little success. The aim of this review is to present a novel view about the exercise-promoting effects on the IS, underlying the importance of the intensity and chronicity at which is performed, and finally, we will address the data available about some molecular mechanisms that seem to be crucial in fostering such changes.

EFFECTS OF EXERCISING ON THE IMMUNE CELLS

Monocytes

These cells have been vastly studied in this context [7, 10, 11] and data tend to be controversial [2, 4, 11–13]. Nonetheless, recent reports postulate that enduring exercise increases monocytes subpopulation [2, 8, 12]. Regarding the post-exercise period (PE), data appear to be less consistent, some studies described a decline during this period, while others found a continuous increment for up to 4 hours after an exercise bout [2, 4, 11], such a marked dif-

ference seemed to reside on the different exercise paradigms used. Other interesting outcomes showed that peritoneal phagocytes in rats increased in number when animals were previously habituated to an exercise condition, suggesting a training effect, while a decrease was perceived when such habituation did not occur, demonstrating that contrary results may rely on the presence or absence of previous habituation [12].

On the other hand, other works determined that the relationship between exercise intensity and health was inverted, the higher the intensity the more negative the impact on the exercise performer's health [4, 8, 9, 11, 14]. As seen in other work, chronicity plays a role too. Chronic training at moderate intensity diminished morbidity and mortality in mice infected with HSV-1 virus, while single bouts of exercise presented no changes on those parameters [7, 10], this protective effect was completely blunted by depleting macrophages with clodronate encapsulated liposomes. Other investigation demonstrated that, chronic exercise performed moderately was also related to an enhancement of the phagocytic activity, increasing the index of the reticulo-endothelial system, glucose consumption and superoxide anion production in mice, which suggested a more reactive and highly metabolic state of macrophages in animals that performed exercise under these conditions [15].

In contrast, chronic exercise performed at a higher intensity decreased the proportion of these cells in specific tissues of rat, in addition to affecting negatively their phagocytic activity when compared to a group of trained rats at a lower intensity and non-trained [12]. Moreover, a recent investigation demonstrated that exercise performed to exhaustion, generated a rise of a pro-inflammatory phenotype of macrophages (CD14⁺⁺/CD16⁺) and a non-classical one (CD14⁺/CD16⁺⁺), such changes were accompanied by a major production of pro-inflammatory cytokines (IL6 and TNF α) [8]. Further investigation might be needed to determine which other aspects could be affected and which mechanisms are involved.

Neutrophils

This population conforms nearly 60% of the total cells from the pool in circulation in humans. As major effectors of the innate immunity [2, 4, 11], neutrophils became the center of attention of many studies involving the effects of exercise on the IS.

The information about the effects that exercise produces on these cells is consistent [2, 11, 13,

16–18]. In one experiment, an increase of neutrophils was reported during an exercise bout (resistance and endurance exercise), which was sustained for up to 9 hours after the exercise quote [2]. Such results were tested under different conditions, two different intensities of exercise performed acutely on a single bout: moderate (70% of ventilation threshold) or high intensity (90% of ventilation threshold), both cases turned out to increase the amount of these cells in circulating blood [18].

Physical activity not only increases the number of neutrophils in circulation, but also activates them and turns them into a more reactive state too [16, 17, 19, 20]. This has been tested through the measurement of several markers such as CR3 and FcYIII (a pattern recognition receptor capable to bind to bacterial molecules and a receptor that binds to the Fc fraction of antibodies), and results indicated that intense exercise increased the expression of these molecules, suggesting their activation and a more reactive state towards infections [19]. Nevertheless, there is information demonstrating that exercise performed at lower intensity decreases the expression of CD62L on these cells, an adhesion molecule involved in the interaction between immune cells and endothelial cells [17], suggesting in this case, an impaired migration capacity.

Interestingly, some studies focused on the effects of the chronic performance of exercise showed a reduction of this cellular subpopulation. In the same line, one study carried out in fit people (subjects who had worked out for at least 10 years of enduring exercise) demonstrated that these subjects possessed a reduced count of circulating neutrophils at rest compared to age match but non-trained controls. After an acute bout of exercise, the count of neutrophils increased in both groups, but the number of cells in the pre-trained group remained lower than that of the non-trained [16]. Similar findings were obtained when the phagocytic activity of neutrophils was examined, demonstrating that the performance of chronic training is able to elicit negative, long-term changes in the neutrophil population.

Moreover, the effects of the regular practice of exercise at a moderate intensity can be tracked down after a two months period of exercise detraining [20]. In this investigation, subjects who were trained chronically at a moderate intensity, increased several neutrophil features, such as chemotaxis, phagocytosis, citrate synthase activity and mitochondrial membrane potential [20].

T-Lymphocytes

This immune cell population has been amply studied on this subject due to its importance at orchestrating cell-mediated immune responses, in addition to the central role that T lymphocytes possess on adaptive ones [11, 13].

In terms of the impact that exercise has on this population of cells, a prevalent view suggests that T-lymphocytes increase during exercise, and shortly after the training period a slow recovery is observed [21]. This recovery can reach negative values when compared to basal measurements [17, 21–26]. Thereafter these cells seem to follow a similar dynamic than previously reviewed cell subpopulations, meaning that changes in T-lymphocytes vary depending on intensity and duration of the exercise. For instance, one report suggested that moderate to intense exercise (70-90% of the subject's maximal exercise intensity, VO₂ max. As estimated from a preliminary maximal oxygen consumption test.) promoted an increase of T cells up to 48% in well-trained individuals [27]. In turn, lower intensities (under 60% VO₂ max.) left this subpopulation unchanged [17].

Nevertheless, the effects of exercise can also change the differentiation of T-lymphocytes, decreasing the ratio between CD4⁺/CD8⁺ cells in humans [18, 27].

As discussed earlier, the relation between high-intensity exercise and the propensity of getting upper respiratory tract infections (URTIs), has led to explore the role that different immune cells have on this phenomenon, being the T-lymphocytes no exception. One recent research proved that long term training at a high intensity (>90% VO₂ max.) increased the proportion of T cells CD4⁺/CD25⁺ in mice, such effect was not obtained when mice performed at a lower intensity (60% VO₂ max. [26]). In other studies carried out in humans, subjects were asked to perform until exhaustion (112% VO₂ max.), resulting in an acute decrease in the total population of T cells [21]. Some other findings suggest that a long-lasting performance of physical activity can also impair T-lymphocytes proliferative capabilities independently of intensity [28]. In addition to these findings, one recent work demonstrated that strenuous exercise not only reduced the number of these cells but also promoted their change to a type 2 profile and to a regulatory type [29]. These results could partially explain the vulnerability seen in high-performance athletes.

In terms of the proliferative capability of these cells, the consensus stipulates that high intensity exercise impairs T cells proliferation [1, 26, 28, 30], while moderate-intensity exercise enhances it [1, 31]. Nonetheless, a meta-analysis of 24 selected articles concluded that long-lasting exercise (>1 hour), similar to high intensity exercise, impairs the proliferative response of lymphocytes [28].

On the other hand, the expression of relevant activation molecules on T cells has been analyzed [17, 23–26, 31]. One experiment was carried out in old subjects, which showed an increase in the expression of CD4+ /CD28+ cells in those individuals who were moderately trained. Being the CD28+ bearer cells associated with enhanced cytokine production, cell proliferation and differentiation [25]. In the same line, T cells from rats trained chronically (6 weeks at 60% of their VO₂ max) increased the expression of CD54 and CD30 molecules, considered by the authors indicators of enhanced activation and migration [31].

Other investigations have focused on the changes in the production of interleukins by T-lymphocytes, trying to elucidate if exercise is able to favor profile 1 or 2 [25, 31–34]. Once again, data provided is controversial, albeit the majority of studies report that moderate-intensity exercise increases the proportion of T cells producing IFN γ , TNF α and IL6 [25, 33, 34], and diminishes those producing IL4 and IL10, (favoring a TH1 response) [32, 33]. On the other hand, strenuous exercise evokes the opposite effect, favoring the production of IL10 and IL4 in these cells. These changes as we will discuss later might be responsible for a further affectation of the catecholamin, glucocorticoid, and prostaglandin systems [29].

B-Lymphocytes

This subpopulation is another major component of the adaptive response against pathogens and besides that, B cells represent a key component of the humoral response.

Information of the relation between these cells and exercise is scarcer than that of T cells, and their ability to produce immunoglobulins represents another factor to keep in mind [2, 13, 35].

One group of research described that exercise at a high intensity, (112% VO₂ maximum work capacity), decreased the amount of these cells [36], while lower intensities, in a huge range (70–95% VO₂ max.) evoked the opposite effect [27, 37]. Nevertheless, a recent work reported no change in

B-lymphocytes composition independently of the duration and intensity during an exercise bout (PE, at 76%, 87%), including a report of a post exercise period of one hour after finishing it [23]. Such findings may highlight the variability of effects obtained through different paradigms of exercise. For example, unlike the effects attained with high intensities-aerobic-exercise, strength exercise at similar intensities increased the amount of circulating B-lymphocytes [22, 38].

B-lymphocyte's proliferation responds inversely to the intensity of the exercise performed, being increased when moderate exercising tasks are performed chronically (60–75%) and being diminished at high, strenuous ones [31, 39, 40]. Similarly to T lymphocytes, strenuous bouts of exercise (100% VO₂ max.) impaired B lymphocytes production of superantigen B and their proliferative capacity, this was tested *in vitro* against *Staphylococcus aureus* [40]. These results were related to a redox imbalance in total lymphocytes, which was assessed by the increase of thiobarbituric acid reactive substances and a decrease in activity of the antioxidant enzyme catalase.

On the other hand, an increased reactivity of B cells related to chronic moderate exercise has been associated with a major consumption of glucose and glutamine, as well as a glutamate and aspartate formation [31], which could hint that the opposite effect produced by high intensity exercise could be partially explained by the exhaustion of energy reservoirs.

As said before the affectation of B cell's production of Ig's by exercise must be kept in mind, and several data stipulates that chronic-moderate-exercise enhances their production, particularly IgG, IgM and IgA [31, 41–43], partly though the synthesis of IL4, IL6, IL10, TNF α and TGF β , all of them molecules involved in the regulation of immunoglobulin's production [31]. In accordance to the previous statement, voluntary exercise in mice during a period of 43 days enhanced the production of IgG specific to a previous exposed antigen up to 1.9 times the amount seen in the control non-exercised groups. Interestingly the IgG developed against such antigen possessed a significant longer half-life in exercised vs. non exercised animals [42].

On a different experiment, other molecular markers reflecting activation on B-lymphocytes have been analyzed, like CD54 and CD30 molecules, and in this work moderate-chronic-trainings was able to increase the expression of both molecules [31], while the migration marker CX3CR1 was found increased only

in subjects submitted to a higher intensity without reaching strenuous levels [23].

Natural killer cells

Natural killers (NKs) represent the first line of defense against transformed cells or infected ones, these cells can act immediately without any previous activation and due to its role, it is not surprising that they are widely distributed through all the body [11, 13].

Once more, information about this cell subset and its relationship to exercise seem to be inconsistent [27, 30, 36, 44–46]. Nevertheless, a particularity to be underlined rises: NKs population seems to be increased by high intensity and exhausting exercise bouts (75–112% VO₂ max.) [27, 30, 36]. Some studies explored the effect of a gradually increasing intensity of enduring exercise on this cell subpopulation and found that, the higher the exercise intensity the bigger the amount of NKs that were driven into circulation, when analyzed in detail, this increase was particularly given for the CD16+/CD57+ cells, markers that suggested a mature NK subpopulation and with enhanced lytic capacity [18, 47]. Noteworthy, such effect was not emulated by two bouts of exercise performed one after the other, denying an accumulative effect [24].

Likewise, changes in the function of NKs have been assessed, and an improvement of their proliferative capacity was perceived after a strenuous bout of exercise performed at 112% of maximal work capacity [36]. Similar findings were reported for their lytic capacity, which was tested on individuals that underwent an intense exercise quote of 60 minutes [45]. Along with this data a recent study carried out in mice, determined the effects of voluntary wheel running on the incidence and growth of tumors. Results showed a reduction of nearly 60% in both parameters in those mice that ran versus those that did not. Running mice showed a significantly increased infiltration of NKs in tumors, and when depleted, the beneficial effects of exercise were completely blunted, similar results were achieved when β adrenergic and IL6-activity were blocked [48].

In terms of the molecular mechanisms that might contribute to the changes in function and composition induced by exercise on these cells, some data showed that glutamine oxidation and lactate production are key on determining an impairment on NK's function during exhausting exercise bouts [24, 36].

Cytotoxic T lymphocytes

These cells have been less studied within this topic. Albeit the effect that exercise elicits on their composition has been poorly studied, data once more contradicts among reports. Some of them suggesting an increase in their quantity in blood, during and immediately after exercise [2, 3, 13, 27], while others and more recent studies demonstrated that they are particularly resistant to change as a consequence of exercise at moderate intensities [39, 43, 46]. Nevertheless, this cells subpopulation like NKs increase in composition with high-intensity exercise [27, 49]. And such an increase is favored in those cells that have been activated, like CD8+/CD62-/CD11high cells and CD27- cells (a late differentiated cell marker) [17, 21]. Even though moderate exercise does not change the composition of cytotoxic T cells, it enhances their production of IL2, IFN, TNF, IL6, IL4, and IL10 [5, 49].

Other studies focused on the expression of apoptotic or migration markers, showed that both processes were favored by intense exercise. For testing apoptotic processes, Annexin V expression was estimated at different intensities of exercise, demonstrating that at high intensities the expression of this molecule increased, while CX3CR1 molecule, a typical molecule for reporting migrating cells, arose at moderate but diminished at high intensities exercise and post-exercise [23, 50]. There is no doubt that more research needs to be done in regard to these cells, which perform such an important role in immune surveillance tasks.

MOLECULAR CHANGES BY EXERCISE WITH IMMUNE-MODULATORY RELEVANCE

Several molecular pathways that are activated by exercise potentially affect several immune aspects. This statement arises the problem of considering how these molecular changes, belonging to different systems, overlay and interact to generate positive or negative feedbacks that impact on different processes of the IS function.

The amount of systemic changes produced in the body by physical activity is huge, involving the CNS, endocrine system, and immune system among others that have been less explored. The biochemical consequences of exercising could explain not only the changes in composition or functionality of specific immune subpopulations but they can provide answers

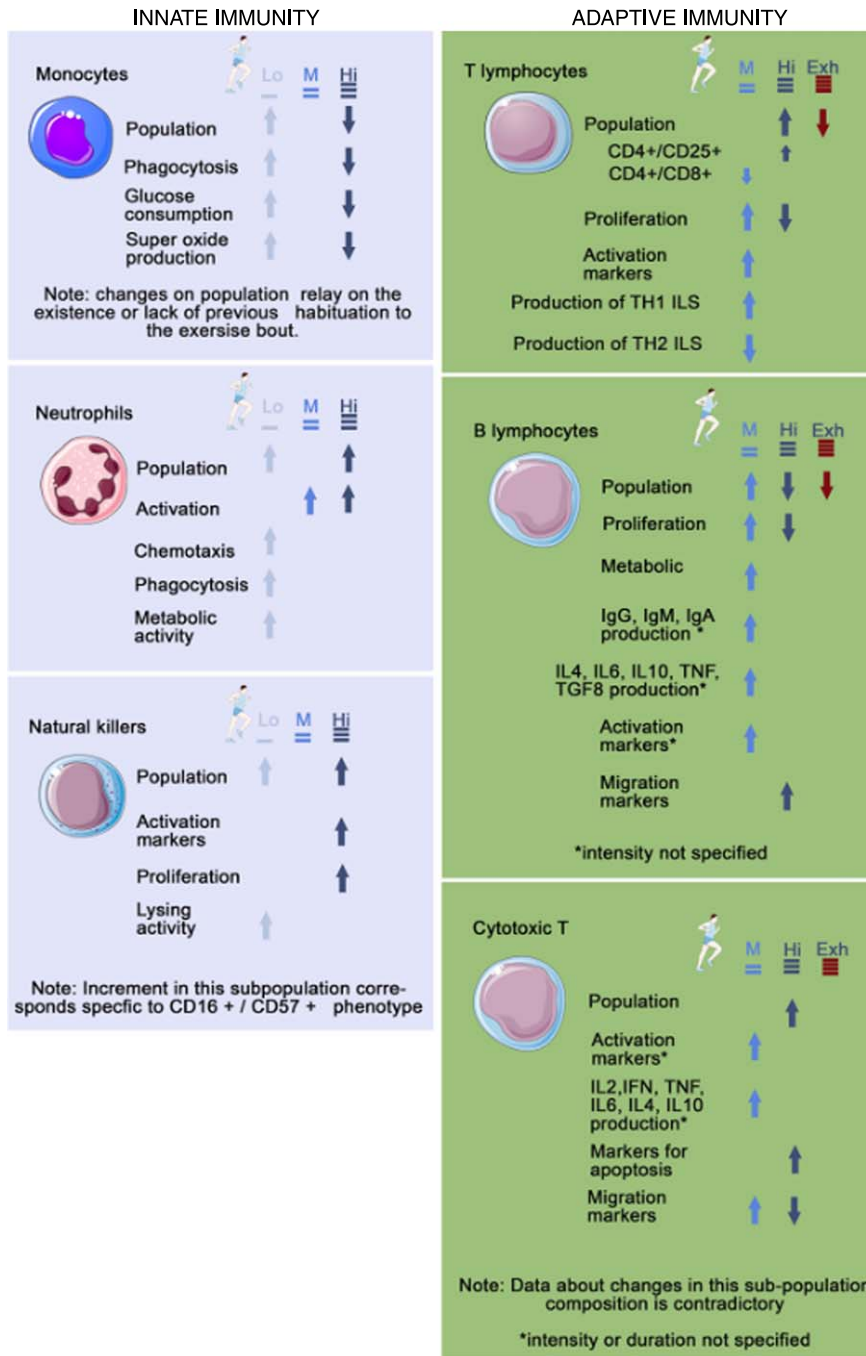


Fig. 1. Effects of exercise at different levels of energetic expenditure on the immune cell subpopulations, considering intensity and/or duration of exercise. Parameters that changed when exercising are enlisted in the far left of each square, next to the image of the cell. Symbol ↑ represents an increase, symbol ↓ a decrease of such parameters. On the top right of each square different intensities are presented: Lo (low intensity), M (medium intensity), Hi (high intensity) and Exh (exhausting). No arrow means that there is no data available about such parameter at that intensity. Notes are short hints that apply specifically to that cell subpopulation.

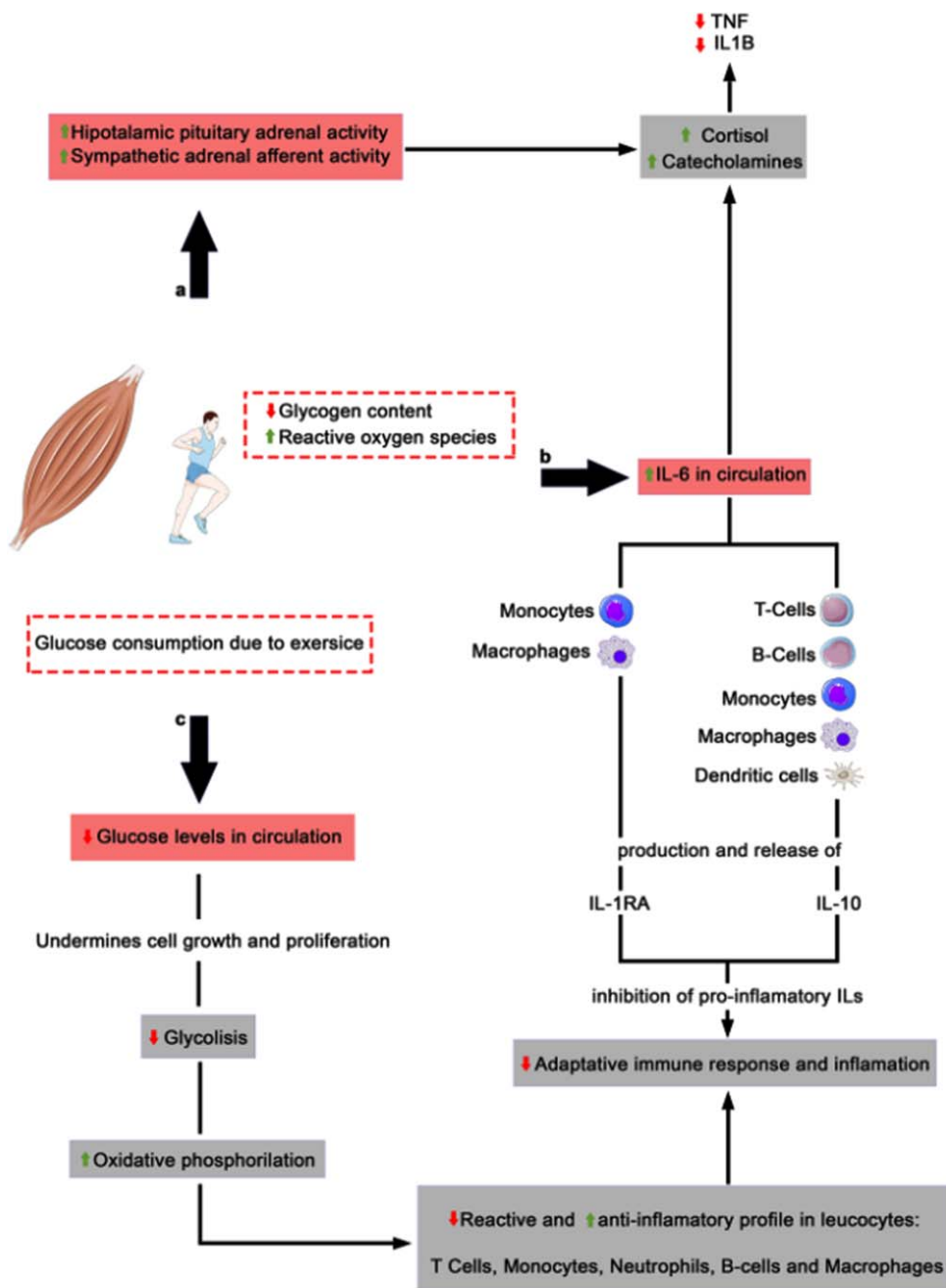


Fig. 2. Molecular changes by exercise with immunoregulatory relevance. Three main axes are described: a) Stress hormones and catecholamines product of the activation of the HPA axis and the sympathetic adrenal afferent activity, b) a hyperproduction of IL 6 by skeletal muscles during contraction and c) a lessening of energy substrates on a systemic level. Altogether regulates the IS composition and function, leaning the system towards a more or less reactive state according to intensity and duration of exercise performed. Arrows pointing up next to parameters mean an increasing in such. Arrows pointing down next to parameters mean a decrease in such.

about the dual effect shown by exercise at different intensities over the immune system.

Among the consequences of physical activity, we encounter the fall of glycogen content in skeletal muscles, which along with the accumulation of

intracellular calcium and the augmentation in the formation of reactive oxygen species [51], causes the synthesis and release of IL6 from skeletal muscles, also known as myokine [52]. The increase of IL6 albeit transient can augment up to 100-fold its lev-

els at rest, depending on the time or intensity of the exercise performed [13, 51].

Concomitantly, this transient increase in IL6 induces the rise of the anti-inflammatory cytokines IL10 and IL1 Receptor Antagonist (IL1 RA). IL1RA is secreted mainly by monocytes and macrophages and inhibits the activity of IL1 β , a potent detonator of pro-inflammatory responses [51, 53]. IL10 is produced by a wide variety of leukocytes, including T cells, B cells, monocytes, macrophages, and dendritic cells, and its functions focus on the downregulation of adaptive immune responses and inflammation, through the decrease in the expression of molecules such as MHC, ICAM I, CD80 and CD86 on antigen-presenting cells (APC, [32, 51]).

The increase of IL6 levels in circulation can promote the release of cortisol from the adrenal glands [53], an important effector of the endocrine system, and also a product of the activation of the hypothalamus Pituitary Adrenal Axis (HPA), which reinforces an anti-inflammatory profile of the IS on a systemic level [51, 54].

Another factor to consider is that performing exercise and physical activity elicit an increment of glucocorticoids and catecholamines on a systemic level, this being carried out through the activation of the HPA axis and from afferent impulses sent by working muscles which in turn increase the sympathoadrenal activity. Both glucocorticoids and catecholamines reinforce the anti-inflammatory systemic response evoked by IL6 through the downregulation of TNF and IL1 β [32, 51, 54, 55].

In terms of energetic metabolism, exercise develops a deficit in energy sources that must be considered [56]. Glucose consumption by the brain, muscles and other organs lessen the systemic glucose levels, which in turn can condition the activation, growth, proliferation and inflammatory profile of several immune cells, including all of the above mentioned [57–59]. Moreover, many cells like macrophages, T cells, B cells, and neutrophils, while in a quiescent state, rely preferentially on oxidative and mitochondrial mechanisms to obtain the energy they need. When activated, these cells change their metabolic profile switching to glycolysis as their main source of energy, which albeit less efficient at producing ATP molecules, is a faster process and transforms pyruvate into lactate which affects glycolysis positively [15, 36, 56, 58, 59]. One major factor that allows this switch to take place is the increased expression of the glucose transporter Glut 1 in the membrane of these cells [57, 59].

A decrease in glucose availability in the extracellular space directly interrupts glycolysis, which undermines leukocyte growth, activation, proliferation, and even favors their turning into an anti-inflammatory phenotype [36, 57, 58]. Glycolytic enzyme GAPDH, when not engaged in glycolysis can bind to TNF γ mRNA post-transcriptionally and block its translation [57, 59].

Several other factors released or depleted during exercise may contribute to influencing the immune response, thereafter more integrative studies must be carried out to increase our understanding of it and even to take advantage of its full potential.

DISCUSSION/CONCLUSION

As has been discussed, the amount of information produced in the past regarding the ways exercise can produce an impact on health, and more specifically on the immune system, is vast and increasing, as it becomes clearer that exercise is a key factor to induce and maintain health, thereby gaining all the benefits that come with it. Such benefits are perceived even at a global economic level.

As seen in other fields of knowledge, the way of approaching this subject has evolved. In the very beginnings, major immune system aspects were studied, and now specific changes in the production and expression of molecules arise as the focus of many pieces of research.

A major issue to consider that we tried to emphasize in this review, is the difficulty to replicate the general conditions and parameters used in each methodology, thereafter generating variation in the data obtained. This variation can be partially explained by the fact that exercise is a complex process that impacts on pretty much every system of an organism, thereafter becoming a complex task to integrate and consider every factor that impinges upon the immune system. Regarding this issue, one objective of this review has been to highlight the importance of the relationship between, intensity, duration and type of exercise performed. In this context, studying the impact of different intensities of exercise raises more questions than answers, particularly at the molecular level.

High-intensity exercise diminishes the number of cells in various immune cell subsets, particularly from the lymphoid lineage [21, 29, 36], and also polarizes them towards a less reactive phenotype, increasing their production of type 2 interleukins [26,

31]. These changes have shed light to understand how such intensities promote a susceptibility of suffering URTI's, as seen in high performance athletes [7, 8, 14, 60]. On the contrary, moderate exercise reduces the possibility of contracting them, as well as improving the ability of the IS to eliminate transformed cells [9, 15, 25, 33]. Moreover, it also favors the production of type 1 interleukins in several cell subpopulations [34].

Up to date, the impact of exhausting exercise on the immune system seems to reside, at some level, on the expenditure of energy-related molecules that become low during and after the exercise bout [56, 57]. The availability of these energy substrates in the blood decreases proportionally to the intensity and/or duration of the exercise performed, thereby, impairing the response of several immune components. Another related pathway between exercise intensity/duration and immune function relays on catecholamine release and other stress-related molecules [3, 13, 51]. One fact to underline is the emergence of different responses that individual cell subpopulations of the IS exhibit due to different sensitivities to the biochemical changes as consequences of the exercise [13].

On the other hand, exercised performed moderately increases the amount of some immune cell subsets as shown in this review [12, 27, 37], and opposite to those effects developed when exercise is performed at higher intensities, reducing the probability of contracting URTI's [4, 9, 21]. Nevertheless, information regarding the changes in the composition of these cells not only seems to be inconsistent but poorly relevant for predicting the efficiency of the IS when challenged. For this reason, focusing our attention towards the functional aspects of each individual cell subset and the whole system might represent a more objective path to face this problem. In general, cells from the IS seem to perform better in those subjects who have undergone moderate-intensity exercise [7, 10, 15, 31, 42], and in some cases even better results were obtained when subjects performed it chronically [26, 31, 42, 48, 61].

In accordance, the interleukine production is also modulated by the exercise. While high-intensity exercise directs many cells towards a Th2 profile [29, 34], mainly lymphocytes, moderate-intensity exercise favors the production of Th1 interleukins [25, 33]. This phenomenon highlights the importance of a context for subjects who exercise, whether subjects are healthy or not, or if it is an infectious or an autoimmune disease, researches will need to expand

the knowledge on this area to warn about risks and benefits of exercising and whether it can be used as a therapy replacement, as it has already been proven against metabolic diseases [62, 63].

Lastly, the integration of more molecular variations with immunomodulatory relevance during exercise is a fertile field to expand our comprehension on this topic. Other systems need to be considered, like the nervous system, which releases neurotransmitters and growth factors which interact with the cells and organs of the IS during and after an exercise bout [51, 55, 64, 65], or the cannabinoid system which has been proven to change during and after the exercise period and in recent works denominated an immunomodulator system [66–69].

ACKNOWLEDGMENTS

Salvador Valencia-Sánchez is a PhD student at Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (513021640). We thank CONACyT which granted Salvador Valencia-Sánchez a fellowship (223625) and to Fideicomiso: bases de colaboración “Transplantes al cerebro” to René Drucker Colín for supporting this work.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SVS wrote this review and designed both figures contained in this work.

RDC Designed and supervised the process of this work.

OCN helped with the design and making of the figures contained in his work, he also revised the text.

OPG Helped with the direction of this work, editing and revision of the manuscript.

JMM Helped with the direction of this work, editing and revision of the manuscript.

REFERENCES

- [1] Santos RVT, Caperuto ÉC, Costa Rosa LFBP. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. *Life Sci.* 2007;80:573-8.

- [2] Freidenreich DJ, Volek JS. The Immune Response to Exercise [Internet]. *Nutr. Enhanc. Sport. Perform.* Elsevier Inc.; 2013. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012396454000096>.
- [3] Freidenreich DJ, Volek JS. Immune responses to resistance exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2012;18:8-41.
- [4] Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol.* 2007;103:693-9.
- [5] LaVoy EC, Hussain M, Reed J, et al. T-cell redeployment and intracellular cytokine expression following exercise: Effects of exercise intensity and cytomegalovirus infection. *Physiol Rep* [Internet]. 2017;5:e13070. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28087817> %5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5256156%5Cnhttp://physreports.physiology.org/lookup/doi/10.14814/phy2.13070>.
- [6] Radom-Aizik S, Zaldivar F, Haddad F, et al. Impact of brief exercise on peripheral blood NK cell gene and microRNA expression in young adults. *J Appl Physiol* [Internet]. 2013;114:628-36. Available from: <http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.01341.2012>.
- [7] Murphy E, Davis JM, Brown S, et al. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2004;287:R1354-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15308485>.
- [8] Slusher AL, Zúñiga TM, Acevedo EO. Maximal Exercise Alters the Inflammatory Phenotype and Response of Mononuclear Cells [Internet]. *Med Sci Sport Exerc.* 2017. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005768-900000000-97070>.
- [9] Matthews CE, Ockene IRS, Freedson PS, et al. Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sport Exerc.* 2002;34:1242-8.
- [10] Davis JM, Murphy E, Brown S, et al. Effects of moderate exercise and oat beta-glucan on innate immune function and susceptibility to respiratory infection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286:R366-R372.
- [11] David G, Katherine J. *Medicine & Science in Sports & Exercise: Acute exercise effects on the immune system.* 2000;32:1-13.
- [12] Ferreira CKO, Prestes J, Donatto FF, et al. Phagocytic responses of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65:1167-73.
- [13] Pedersen BK, Hoffman-goetz L. Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Society.* 2000;80:1055-81.
- [14] Nieman DC, Johanssen LM, Lee JW AK. Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness.* 1990;1:1-14.
- [15] Sugiura H, Sugiura H, Nishida H, et al. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol.* 2012;789-94.
- [16] Blannin K, Chatwin LJ, Cave R, et al. Effects of submaximal cycling and long-term endurance training on neutrophil phagocytic activity in middle aged men. *Br J Sports Med.* [Internet]. 1996;30:125-9. Available from: <http://bjsm.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bjsm.30.2.125%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1332375&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [17] Kurokawa Y, Shinkai S, Torii J, et al. Exercise induced changes in the expression of surface adhesion molecules on circulating granulocytes and lymphocytes subpopulations. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1995;71:245-52.
- [18] Saito Y, Kusaka Y, Shimada M. Effects of exercise intensity on circulating leukocyte subpopulations. *Environ Health Prev Med* [Internet]. 2003;8:18-22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2723261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [19] Gray AB, Telford RD, Collins M, et al. Granulocyte activation induced by intense interval running. 1993;53:591-7.
- [20] Syu G-D, Chen H-I, Jen CJ. Differential effects of acute and chronic exercise on human neutrophil functions. *Med Sci Sports Exerc.* [Internet]. 2012;44:1021-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130467>.
- [21] Gannon G, Rhind S, Shek PN, et al. Naive and memory T cell subsets are differentially mobilized during physical stress. *Int J Sport Med.* 2002;23:223-9.
- [22] Gabriel H, Schwarz L, Steffens G, et al. Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med* [Internet]. 1992;13:359-66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1325959>.
- [23] Navalta JW, Lyons S, Prestes J, et al. Exercise intensity and lymphocyte subset apoptosis. *Int J Sports Med.* 2013;34:268-73.
- [24] Ronsén O, Pedersen BK, Øritsland TR, et al. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol.* 2001;91:425-34.
- [25] Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev.* 2008;14:24-37.
- [26] Wang J, Song H, Tang X, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports* [Internet]. 2012 [cited 2012 Oct 10];22:643-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410542>.
- [27] Kargotich S, Keast D, Goodman C, et al. The influence of blood volume changes on leucocyte and lymphocyte subpopulations in elite swimmers following interval training of varying intensities. *Int J Sports Med.* 1997;18:373-80.
- [28] Siedlik JA, Benedict SH, Landes EJ, et al. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain Behav Immun* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.04.008>.
- [29] Shaw DM, Merien F, Braakhuis A, et al. T-cells and their cytokine production: The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of strenuous exercise. *Cytokine.* 2017;
- [30] Nieman DC, Miller R, Henson D, et al. Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Int J Sports Med.* 1994;15:199-206.
- [31] Navarro F, Bacurau AVN, Pereira GB, et al. Moderate exercise increases the metabolism and immune function of lymphocytes in rats. *Eur J Appl Physiol.* 2013;113:1343-52.
- [32] Lancaster G, Halson S, Khan Q, et al. Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* [Internet]. 2004;10:91-104. Available from: http://www.researchgate.net/publication/8096824_Effects_of_acute_exhaustive_exercise_and_chronic_exercise_training_on_type_1_and_type_2_T_lymphocytes/file/79e4150c59a6b1619f.pdf.
- [33] Terra R, Alves PJF, Gonçalves Da Silva SA, et al. Exercise improves the Th1 response by modulating cytokine and NO

- production in BALB/c mice. *Int J Sports Med.* 2013;34:661-6.
- [34] Zaldivar F, Wang-Rodríguez J, Nemet D, et al. Constitutive pro- and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol [Internet]*. 2006;100:1124-33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357073>.
- [35] Bruunsgaard H, Pedersen BK. Effects of exercise on the immune system in the elderly population. *Immunol Cell Biol.* 2000;78:523-31.
- [36] Frisina JP, Gaudieri S, Cable T, et al. Effects of acute exercise on lymphocyte subsets and metabolic activity. *Int J Sports Med [Internet]*. 1994;15:36-41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8163324>.
- [37] Córdova A, Sureda A, Tur JA, et al. Immune response to exercise in elite sportsmen during the competitive season. *J Physiol Biochem [Internet]*. 2010;66:1-6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13105-010-0001-2>.
- [38] Dohi K, Mastro AM, Miles MP, et al. Lymphocyte proliferation in response to acute heavy resistance exercise in women: Influence of muscle strength and total work. *Eur J Appl Physiol.* 2001;85:367-73.
- [39] Lin YS, Jan MS, Chen HI. The effect of chronic and acute exercise on immunity in rats. / Effet de l'exercice chronique et aigu sur l'immunité chez des rats. *Int J Sports Med [Internet]*. 1993;14:86-92. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=sph&AN=SPH360924&site=ehost-live>.
- [40] Tossige-Gomes R, Costa KB, Ottone V de O, et al. Lymphocyte Redox Imbalance and Reduced Proliferation after a Single Session of High Intensity Interval Exercise. *PLoS One.* 2016;11:e0153647.
- [41] Elphick GF, Wieseler-Frank J, Greenwood BN, et al. B-1 cell (CD5+/CD11b+) numbers and nIgM levels are elevated in physically active vs. sedentary rats. *J Appl Physiol [Internet]*. 2003;95:199-206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651863>.
- [42] Suzuki K, Tagami K. Voluntary wheel-running exercise enhances antigen-specific antibody-producing splenic B cell response and prolongs IgG half-life in the blood. *Eur J Appl Physiol.* 2005;94:514-9.
- [43] Vilorio M, Lara-Padilla E, Campos-Rodríguez R, et al. Effect of moderate exercise on IgA levels and lymphocyte count in mouse intestine. *Immunol Invest.* 2011;40:640-56.
- [44] Borges GF, Teixeira AMBM, Rama LMLP, et al. Diferenças em populações de células exterminadoras naturais (Natural Killers-NK) sanguíneas periféricas entre atletas de caiaque e não atletas. *Rev. Bras. Med. do Esporte [Internet]*. 2012;18:305-7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-86922012000500004&lng=pt&tlng=pt.
- [45] Kappel M, Tvede N, Galbo H, et al. Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine. *J Appl Physiol [Internet]*. 1991;70:2530-4. Available from: <http://jap.physiology.org/content/70/6/2530.long>.
- [46] Miles MP, Kraemer WJ, Grove DS, et al. Effects of resistance training on resting immune parameters in women. *Eur J Appl Physiol.* 2002;87:506-8.
- [47] Zimmer P, Schenk A, Kieven M, et al. Exercise induced alterations in NK-cell cytotoxicity - methodological issues and future perspectives. *Exerc Immunol Rev [Internet]*. 2017;23:66-81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28230531>.
- [48] Pedersen L, Idorn M, Pedersen BK, et al. Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Short Article Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent. 2016;554-62.
- [49] LaVoy EC, Bosch JA, Lowder TW, et al. Acute aerobic exercise in humans increases cytokine expression in CD27- but not CD27+ CD8+ T-cells. *Brain Behav Immun [Internet]*. 2013;27:54-62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.09.006>.
- [50] Pereira GB, Prestes J, Tibana RA, et al. Acute resistance training affects cell surface markers for apoptosis and migration in CD4+ and CD8+ lymphocytes. *Cell Immunol [Internet]* 2012;279:134-139. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.11.002>.
- [51] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol [Internet]*. 2011;11:607-15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3041>.
- [52] Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise—the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci [Internet]*. 2007 [cited 2012 Apr 15];28:152-156. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331593>.
- [53] Steensberg A, Fischer CP, Keller C, et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Metab.* [Internet]. 2003;285:E433-E437. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00074.2003>.
- [54] Padgett D, Glaser R. How stress influences the immune response. *Trends Immunol.* 2003;24:444-8.
- [55] Moscoso M. Psiconeuroinmunoendocrinología from the Mind to the Cell: The Impact of Stress on Psiconeuroinmunoendocrinología Manolete S. Moscoso, University of South Florida / Health. *Lib Rev Psicol.* 2009;15:143-52.
- [56] Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence. *Immunity [Internet]*. 2013;38:633-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23601682>.
- [57] Palmer CS, Ostrowski M, Balderson B, et al. Glucose metabolism regulates T cell activation, differentiation, and functions. *Front Immunol.* 2015;6:1-6.
- [58] Borregaard N, Herlin T. Energy Metabolism of Human Neutrophils during Phagocytosis. *J Clin Invest [Internet]*. 1982;70:550-7. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/110647>.
- [59] Palmer CS, Cherry CL, Sada-Ovalle I, et al. Glucose Metabolism in T Cells and Monocytes: New Perspectives in HIV Pathogenesis. *EBioMedicine [Internet]*. 2016;6:31-41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.012>.
- [60] MacKinnon LT. Special feature for the Olympics: Effects of exercise on the immune system: Overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol.* [Internet]. 2000;78:502-509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050533>.
- [61] Bartlett DB, Shepherd SO, Wilson OJ, et al. Neutrophil and Monocyte Bactericidal Responses to 10 Weeks of Low-Volume High-Intensity Interval or Moderate-Intensity Continuous Training in Sedentary Adults. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1-12.
- [62] Handschin C, Spiegelman BM. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. 2008;454:463-9.

- [63] GROUP DPPR. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. *N Engl J Med* [Internet]. 2002;346:393-403. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa012512>.
- [64] Gomes EC, Silva N, Oliveira MR De. Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species. *Production*. 2012;2012.
- [65] Hoffman-Goetz L, Pedersen BK. Exercise and the immune system: A model of the stress response? *Immunol Today*. 1994;15:382-7.
- [66] Heyman E, Gamelin F-X, Goekint M, et al. Intense exercise increases circulating endocannabinoid and BDNF levels in humans—possible implications for reward and depression. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2012 [cited 2012 Jul 14];37:844-51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029953>.
- [67] Sparling PB, Giuffrida a, Piomelli D, et al. Exercise activates the endocannabinoid system. *Neuroreport* [Internet]. 2003 [cited 2012 Aug 22];14:2209-2211. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14625449>.
- [68] Klein TW, Newton C, Larsen K, et al. The cannabinoid system and immune modulation Abstract: *J. Leukoc Biol*. 2003;74:486-96.
- [69] Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: An overview. *Immunobiology* [Internet]. 2010 [cited 2012 Jul 23];215:588-597. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153077>.

AUTHOR COPY