UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Felipe Alavarce de Oliveira

**Efeito do exercício físico na capacidade fagocítica dos macrófagos:
comparação entre ratos jovens e idosos**

BAURU
2014

Felipe Alavarce de Oliveira

**Efeito do exercício físico na capacidade fagocítica dos macrófagos:
comparação entre ratos jovens e idosos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: **Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara**

Versão Corrigida

BAURU
2014

Oliveira, Felipe Alavarce
Ol4e Efeito do exercício físico na capacidade fagocítica dos
macrófagos: comparação entre ratos jovens e idosos /
Felipe Alavarce de Oliveira. - Bauru, 2014.

91p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara.

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru,

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo n°: 018/2012
Data: 09/08/2012

DEDICATÓRIA

Aos meu país, Júlio e Elizabete

Meu pai Júlio, por toda sua luta em prol de seus filhos, pelos ensinamentos eternos, de humildade, dignidade e trabalho de como ser um homem.

Minha mãe Elizabete, por toda sua perseverança em educarmos da melhor forma, e principalmente por toda sua sabedoria espiritual.

A minha amada esposa, Rafaela

Elemento fundamental em minha caminhada neste trabalho. Exemplo de dedicação, esforço e trabalho. Uma companheira, fiel e dedicada.

Por muitas vezes cansado eu olhava para ela e via uma estudante incansável, carregando, de certa forma, minhas energias para continuar. Nunca furtando-se do trabalho em auxiliar-me nas dificuldades, estando finais e finais de semana ao meu lado, apoiando-me.

Simplesmente Obrigado!

Carinhosamente ao meu irmão, Franklin

*Estive ao meu lado e ao lado de meus pais durante os momentos
mais difíceis em minha formação para que pudesse, eu, chegar
até aqui. Exemplo de um bom coração.*

“No reino dos fins, tudo tem um preço ou uma dignidade. Quando uma coisa tem
um preço, pode pôr-se, no lugar dela, qualquer outra como equivalente; mas
quando uma coisa está acima de todo preço e, portanto, não permite equivalente,
então ela tem dignidade.”

(Immanuel Kant)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dado à oportunidade de formar-me. “Agradeço a Deus”, é muito pequeno a tudo que meu pai supremo me proporciona. Em momentos de angústia ele me dá a paz; em momentos de dúvida o discernimento; e quando a noite tende a perdurar, vem ele novamente, com uma linda estrela nos iluminar. Agradeço por viver, por sorrir e agradecer. Obrigado Senhor por todas suas obras em minha vida!

À minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Soares Lara;

Como agradece-la?

Difícil trazer para palavras a importância que foram esses dois anos percorridos ao seu lado. Poderia te agradecer por diversas coisas, por atitudes, por ensinamentos, ou simplesmente por você ser essa pessoa que é. Poderia também agradecer a Deus por ter me dado à oportunidade de sua convivência. Porém acho que tentarei fazer um pouco melhor, deixarei entre nós uma gratidão eterna. E tentarei que essa gratidão seja refletida aos meus alunos, buscando ser um pouco do que você foi para mim, simplesmente um “MESTRE”.

Mestre - “Depois de pai, é o nome mais nobre e mais doce que um homem pode dar ao outro”.

“Edmundo Amicis”

Este é o verdadeiro significado de ser um “Mestre”, não apenas por que possui um título, timbrado em papel, o qual poderá perde-se com o tempo.

Obrigado por todos seus ensinamentos os levarei para muitos!

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB pelos ensinamentos e orientações. Obrigado ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pela sua simplicidade e capacidade inquestionável. Obrigado à Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, por todo ensinamento passado. Obrigado ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, pela sua dedicação a patologia e demonstração de amor ao ensino.

Ao Prof. Dr. Júlio Wilson dos Santos pela sua imensa capacidade, por sua ajuda inquestionável para formulação deste trabalho. Um exemplo de professor sempre presente nos momentos necessários. Um convívio que levarei para meus alunos, pois neste Professor eu conheci um exemplo de simplicidade e amor ao que faz. Acolheu-me, sem muitas perguntas, pelo simples fato de poder ajudar-me. Obrigado Professor Júlio por toda sua ajuda e exemplo de profissional serei eternamente grato.

Aos funcionários laboratório da UNESP Bruno Alvares Viscelli e Sérgio Alves Arcangelo pela ajuda e dedicação quando necessário. Profissionais altamente qualificados e dedicados. Espero poder retribuir de alguma forma todo auxílio que me foi dado durante minha presença na UNESP.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia, Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Felipe e Marina Dos Santos Corrêa, por toda ajuda durante esses dois anos do mestrado. Obrigado pela ajuda!

Aos funcionários do CIP: Ms Márcia Sirlene Zardin Graeff, por ter contribuído com a análise de microscopia; ao funcionário Renato Pereira Murback que sempre esteve presente quando necessário, e com sua inteligência extraordinária contribuindo com os materiais da pesquisa; e em especial ao funcionário Marcelo Milanda, que teve uma participação fundamental nesses dois anos percorridos, ajudando sempre que necessário, e

fundando ali uma parceria profissional muito importante, agradeço você por ter-me entendido em alguns momentos mais difíceis desta formação.

“Gratidão é um sentimento de reconhecimento, uma emoção por saber que uma pessoa fez uma boa ação, um auxílio, em favor de outra. Gratidão é uma espécie de dívida, é querer agradecer a outra pessoa por ter feito algo muito benéfico para ela”.

Aos amigos Karen Henriette Pinke, Nara Lígia Martins Almeida e Taiane Gardizane, por toda ajuda e disposição, agradeço por todo auxílio, colaborando com muito conhecimento e trabalho, por isto, serei sempre grato.

Aos amigos Heliton Gustavo de Lima e Pepe Burgos pelos momentos de descontração e muita risada.

Aos demais amigos da Patologia: Ana Paula Maddi, Francisco Abreu, Agnes Assao, Diego Maurício Bravo Calderón, Alexandre García, Natália García, Magda Paula Nascimento, e outros, com quem dividi momentos de estudo e descontração.

E a todos que ajudaram direta ou indiretamente de certa forma nesses dois anos de muito estudo e trabalho!!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru - USP na pessoa da excelentíssima Diretora Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Bauru, USP pela oportunidade de fazer parte dessa instituição que é referência na área acadêmica.

À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Contú.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP na pessoa da Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, responsável por esta disciplina.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida durante o período integral do curso de Mestrado.

“Por tudo que vivi, percebo que a vida não é simplesmente: nascer, viver e morrer. Mas sim renascer, evoluir e continuar. Buscai-vos o seu Deus interno, para assim podeis enxergá-lo em tudo que vos vê”

“Felipe Alvarce”

RESUMO

Em animais, os protocolos de Treinamento Físico Crônico (TF) aeróbio de nível moderado têm sido relacionados com a melhora da capacidade do sistema imunológico, como por exemplo o aumento dos leucócitos e a maior produção de citocinas e de óxido nítrico. Durante o envelhecimento, ocorre uma desregulação do sistema imunológico, conhecido como Imunossenescência, a qual contribui para o aumento da suscetibilidade a infecções, câncer e autoimunidade, e redução da resposta vacinal. Assim, o presente estudo verificou os resultados do TF sobre o sistema imunológico, avaliando a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais oriundos de animais jovens e idosos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram utilizados ratos da linhagem Wistar com 60 dias (Jovens) e com 14 meses de idade (Idosos), divididos em quatro grupos: Jovens Sedentários (JS) e Treinados (JT), e Idosos Sedentários (IS) e Treinados (IT). O protocolo de TF foi realizado através do exercício de nível por meio de natação por 45 minutos, três vezes na semana, por oito semanas consecutivas. Após, os macrófagos peritoneais foram desafiados *in vitro*, durante 30 e 120 minutos, com *Escherichia Coli* (*E. coli*) ou *Candida albicans* (*C. albicans*), previamente corados com FITC. Células com microrganismos internalizados foram quantificadas por meio de microscopia de fluorescência. **RESULTADOS:** Após o protocolo de EF, o percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, obtidos a partir dos ratos jovens ou idosos, foi maior ($p < 0,05$) em relação aos sedentários. Estes achados foram verificados tanto após desafio com bactérias *E. coli* quanto com fungos *C. albicans*, e independente do período de desafio. Os valores obtidos em 120 minutos foram superiores que aqueles correspondentes aos 30 minutos de desafio. Após o EF, os valores percentuais de macrófagos com microrganismos internalizados foram maiores entre os idosos que aqueles observados entre os jovens, independente do período de desafio ($p < 0,05$). Estas diferenças etárias também ocorreram entre os animais sedentários. **CONCLUSÕES:** O exercício físico aeróbio em nível moderado foi capaz de alterar a função fagocítica dos macrófagos. A maior internalização de microrganismos por parte dos macrófagos oriundos dos idosos, em relação aos jovens, pode refletir um estado prévio de ativação celular, em função do aumento da atividade inflamatória basal observado em idosos (*inflammaging*).

Palavras-chave: Exercício Físico, Imunossenescência, Idoso

ABSTRACT

Physical Exercise Effect in the Phagocytic Capacity of the macrophages: Comparison between Young and Old Mice

In animals, the aerobic physical training (PT) of moderate level have been related with the improvement of the immunologic system capacity, like the increase of leukocytes and a higher production of cytokines and nitric oxide. While ageing, there is a deregulation of the immunologic system, known as Immunosenescence, which contributes to the increasing of the susceptibility to infections, cancer and autoimmunity, and the vaccine response. Thus, the present study examined the results of PF on the immune system, evaluating the phagocytic capacity of peritoneal macrophages derived from young and old animals.

Material and Methods: Young (60-day old) and old (14-month old) Wistar mice were divided in four different groups: Sedentary Youngsters (SY) and Trained Youngsters (TY), Sedentary Elderly (SE) and Trained Elderly (TE). The physical training was based in an moderate aerobic PE protocol through swimming sessions of 45 minutes each, three times a week, for eight consecutive weeks. After that, the peritoneal macrophages were challenged in vitro, during 30 to 120 minutes, with *Escherichia Coli* (*E.coli*) or *Candida albicans* (*C.albicans*), previously dyed with FITC. Internalized microorganism cells were quantified through fluorescence microscopy. **Results:**After the PE protocol, the percentage of peritoneal macrophage with internalized microorganisms, from young and old mice, was higher ($p<0,05$) related to the sedentary. These findings were verified either after the challenge with *E. coli* bacteria or with *C. albicans* fungi, independently of the challenge time. The values obtained in 120 minutes were higher than those obtained in the 30 minutes of challenge. After the PE, the percentage values of macrophage with internalized microorganisms were higher among the elderly than those observed among the youngsters, independently of the challenge time ($p < 0,05$). These age differences also occurred among the sedentary animals. **Conclusions:** The aerobic physical exercise in a moderate level was able to alter the phagocytic function of the macrophages. The greater internalization of microorganisms in macrophages from the elderly, compared to youngsters, may reflect a previous state of cell activation, due to the increase of of the basal inflammatory activity observed in the elderly (*inflammaging*).

Keywords: Exercise, Immunosenescence, elderly

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Bolsa de tecido de algodão para a colocação dos pesos de chumbo.37
- Figura 2** - Configurações do tanque utilizado para o protocolo de exercício aeróbio (A). Em B, observam-se os pesos de chumbo utilizados para a obtenção das cargas, e em C encontra-se a imagem representativa do tanque utilizado durante os dias de adaptação dos animais ao meio líquido.37
- Figura 3** - Semanas demarcadas para a realização dos testes de lactato mínimo, ao longo do período de adaptação e do protocolo de exercício físico aeróbio (natação por oito semanas), totalizando dez semanas. O primeiro teste (1° LCmin) foi executado no início da terceira semana (primeira semana do protocolo de exercício) e o Teste final (LCmin Final) no último dia da décima semana.38
- Figura 4** - Aparelho utilizado para análise do lactato sanguíneo (A). Microtubo com 50 µl de fluoreto de sódio a 1% após a coleta de 25µl de sangue (B) Tubos capilares de vidro contendo heparina, utilizados para a coleta de sangue dos animais.40
- Figura 5** - Representação da curva de lactato sanguíneo vs carga de trabalho, obtida após a realização do teste de LCmin em um dos animais idosos. As curvas foram obtidas através de um ajuste polinomial de grau 2, com o auxílio do programa de computador Excel. As equações que definem as curvas encontradas possibilitaram o cálculo das menores concentrações de lactato sanguíneo e das respectivas cargas de trabalho. Lan: $y=0,6546x^2 + 1,9227 + 10,361$ (1,5% do PC). A seta indica o maior valor de carga de trabalho (em relação ao PC) suportada antes de atingir a transição metabólica para a via glicolítica (curva ascendente)41
- Figura 6** - Ensaio de fagocitose, por meio do desafio de macrófagos peritoneais, acomodados em placas de cultura, com *Candida albicans*.44
-
-

Figura 7 - Peso corporal dos animais, idosos e jovens, obtido semanalmente, durante o período de oito semanas, com (IT e JT, respectivamente) ou sem (IS e JS) a realização do protocolo experimental de exercício físico aeróbio. * $p < 0,05$, comparando-se com o peso inicial, dentro de cada grupo (Teste t pareado) # $p < 0,05$, comparando-se com o peso final do grupo IT (Teste t não pareado - IT vs IS e JT vs JS); N = 13 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 13 para JS.	51
Figura 8 - Macrófagos peritoneais (com seus núcleos corados em azul – DAPI), obtidos de animais jovens (A, D, E e F) ou idosos (B e C), após desafio in vitro por 30 (A, C e D) e 120 (B, E e F) minutos, apresentando fungos <i>C. albicans</i> (A, B e C) ou <i>E. coli</i> (D, E e F) internalizados (corados em verde – FITC) (microscopia de fluorescência).	53
Figura 9 - Macrófagos peritoneais (com seus núcleos corados em azul – DAPI) com bactérias <i>E. coli</i> (A, B e D) ou fungos <i>C. albicans</i> (C) internalizados (corados em verde – FITC), após desafio in vitro por 30 (A e D) e 120 (B e C) minutos. As setas brancas apontam núcleos alterados morfológicamente, sugestivo de processo de apoptose; as setas laranjas apontam para fragmentos nucleares, sugerindo corpos apoptóticos (microscopia de fluorescência).	55
Figura 10 - Percentual de macrófagos com microrganismos internalizados, <i>C. albicans</i> ou <i>E. coli</i> , após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre sedentários e treinados. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey HSD); N = 12 para IT, N = 12 para IS.	57
Figura 11 - Percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, <i>C. albicans</i> ou <i>E. coli</i> , após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre sedentários e treinados. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey); N = 13 para JT e N = 12 para JS.	58

Figura 12 - Percentual de macrófagos peritoneais com fungos <i>C. albicans</i> internalizados, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre jovens e idosos. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey); N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS.	59
Figura 13 - Percentual de macrófagos peritoneais com bactérias <i>E. coli</i> internalizadas, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre jovens e idosos. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey HSD); N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS.	60

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão do limiar anaeróbio em % de Pc obtidos antes e depois de oito semanas de treinamento físico aeróbio.....	50
--	----

ANEXO

Tabela 1 - Peso corporal, obtido semanalmente, por oito semanas consecutivas de exercício físico aeróbio moderado, imposto sobre ratos idosos (N = 13).	91
Tabela 2 - Peso corporal médio, obtido na primeira e última semana no grupo IS.....	91
Tabela 3 - Peso corporal, obtido semanalmente, por oito semanas consecutivas de exercício físico aeróbio moderado, imposto sobre ratos jovens (N = 13).	91
Tabela 4 - Média e desvio padrão do percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, <i>C. albicans</i> (SC5314) ou <i>E. coli</i> (O:124), após 30 e 120 minutos de desafio in vitro. As células foram obtidas de animais idosos e jovens, treinados ou sedentários. N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS. Teste estatístico Anova one-way e Teste de Tukey HSD a quatro critérios (IT vs IS; IT vs JT; IS vs JS; JT vs JS). *,# p < 0,05, quando comparado com os jovens, no mesmo período de desafio.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
%	Porcentagem
µL	Microlitro
C°	Graus Celsius
C.a	<i>Candida albicans</i>
cels/ml	Células por mililitro
cm	centímetros
E.c	<i>Escherichia coli</i>
EF	Exercício Físico
Fag 30'	Fagocitose em 30 minutos
Fag 120'	Fagocitose em 120 minutos
IFN – γ	Interferon Gamma
Hs	Horas
IS	Idoso sedentário
IT	Idoso treinado
IL	Interleucinas
JS	Jovem sedentário
JT	Jovem treinado
Kg	Quilograma
Lan	Limiar anaeróbio
LCmin	Teste de lactato mínimo
mL	Mililitro
mL/Kg	Mililitro por quilograma
mmol/L	Micromol por litro
min	Minutos
nm	Nanômetro
YEPD	Yeast Peptone Dextrose
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PC	Peso corporal
PFA	Paraformoldeido

pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Rpm	Rotações por minuto
T CD4 ⁺	Linfócitos T auxiliares
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> 2
TLM	Teste de Lactato Mínimo
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
<	Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA IMUNE.....	23
2.2	IMUNOSSENESCÊNCIA.....	26
3	PROPOSIÇÃO.....	29
3.1	OBJETIVOS GERAIS	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	ANIMAIS	35
4.2	PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO REGULAR.....	35
4.3	AVALIAÇÃO DA APTIDÃO FÍSICA DOS ANIMAIS	38
4.4	ANÁLISE DO LACTATO SANGUÍNEO	39
4.5	PESAGEM DOS ANIMAIS.....	42
4.6	PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS DOS MICRORGANISMOS	42
4.7	OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	43
4.8	ENSAIO DE FAGOCITOSE.....	43
4.9	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	45
5	RESULTADOS	47
5.1	ANÁLISE DA MELHORA DO CONDICIONAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS ATRAVÉS DO TESTE DE LACTATO MÍNIMO (LCmin).....	49
5.2	AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	50
5.3	ANÁLISE DA FAGOCITOSE PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	51
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS	73
	APÊNDICE	85
	ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A longevidade entre os seres humanos vem aumentando devido aos avanços tecnológicos e farmacêuticos, além da diminuição nos índices de mortalidade e de natalidade. No Brasil, a população com 65 anos ou mais, antes representada por cerca de 4,8%, atingiu 7,4% em 2010. Ainda, houve um aumento na expectativa de vida para aproximadamente 73 anos, demonstrando um acréscimo de 10 anos em relação a 1980. Estima-se que em 2025, no Brasil, haverá 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos, passando a representar a sexta maior concentração de população idosa do mundo. Possivelmente, em 2060, indivíduos com 65 anos ou mais no Brasil irão representar mais de 25% da totalidade populacional (IBGE, 2010; Harris; Haboubi, 2005).

As previsões das Nações Unidas é que, em 2050, haverá mais do que o triplo da população idosa, em comparação ao século XIX, havendo assim uma inversão na configuração populacional, encontrando-se um grupo maior de indivíduos idosos do que de jovens (Shaw; Goldstein; Montgomery, 2013). Com esse aumento na longevidade, torna-se importante o acompanhamento desta população quanto à melhoria e à manutenção da qualidade de vida; em vista disso, o envelhecimento da população torna-se um desafio importante para as políticas de saúde (Lyon et al., 2006).

O envelhecimento biológico é inexorável, dinâmico e irreversível, sendo frequentemente caracterizado por um aumento da inflamação sistêmica com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, TNF- α , IL-1 β e do reagente de fase aguda, proteína C reativa; os níveis aumentados destes marcadores inflamatórios têm sido implicados na patogênese de várias doenças, incluindo a aterosclerose (Pereira et al., 2013; Leandro et al., 2007), diabetes do tipo II e artrite reumatóide, muitas vezes resultando em um impacto direto na morbidade e mortalidade destes indivíduos (Lyon et al., 2006). Em geral, estudos recentes demonstram que o envelhecimento influencia diretamente o funcionamento do sistema imunológico e que o processo de ativação do sistema imune inato está alterado nesse período da vida, resultando assim em uma inflamação desregulada (Syu et al., 2011).

A atividade física regular e treinamento físico estão associados com a diminuição da inflamação, além de reduzir o risco do desenvolvimento e os sintomas de doenças, e estão relacionados à melhora cognitiva, já que são considerados uma abordagem não medicamentosa eficiente para melhorar e manter as funções cognitivas em idosos saudáveis e pacientes que sofrem de transtorno cognitivo leve (Bherer; Erickson; Liu-Ambrose, 2013). Os mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios do exercício não estão claramente definidos, mas podem estar ligados a mudanças no fenótipo de monócitos (Mota et al., 2009).

Considerando a relação biológica entre o sistema imune e o exercício físico (EF), torna-se importante determinar mais claramente o efeito do EF sobre as células imunes, bem como avaliar se este efeito difere de acordo com a idade e se o EF pode contribuir para o tratamento de câncer, diabetes tipo II, artrites e outras patologias crônicas, que comumente afetam os idosos. A utilização de intervenções não medicamentosas e capazes de melhorar a performance dos sistemas de defesa por profissionais da área da saúde, como fisioterapeutas, educadores físicos e médicos, pode contribuir para uma melhor qualidade de vida (Bherer; Erickson; Liu-Ambrose, 2013).

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA IMUNE

Através da intensa procura por terapêuticas de baixo custo, o TF tornou-se um elemento complementar de fundamental importância para o tratamento de diversas doenças crônicas. Os estudos, relacionando o TF e o sistema imunológico, ganharam força na metade da década de 70, como principal área de interesse na influência sobre as vias aéreas superiores em atletas submetidos a grandes esforços. Tendo uma importância significativa nas alterações da homeostase orgânica, o TF gera uma reorganização de diversos sistemas, como o imunológico, resultando em uma adaptação ao estresse (Bacurau et al., 2009; Voltarelli; Gobatto; Mello, 2002) e interferindo nas várias etapas do processo inflamatório. Por esta razão, o TF tem sido associado com o aumento da atividade antitumoral dos macrófagos, da quimiotaxia dos leucócitos e da atividade fagocítica dessas células em animais e humanos (Ferreira et al., 2007).

Os macrófagos são células antigas na filogenia de metazoários que desempenham papéis críticos na detecção e eliminação de agentes patogênicos (Jiang et al., 2014). Estas células imunes exercem um papel importante na defesa contra microrganismos, sendo reconhecidas como células que desempenham uma função central na regulação da imunidade e da inflamação (Batista et al., 2007). Além de sua participação na defesa contra patógenos, os macrófagos também desempenham diversas funções, incluindo a homeostase, a liberação de citocinas, mediação da cicatrização e ação anti-inflamatória (Jiang et al., 2014).

O TF pode ser classificado em três níveis de carga: leve, moderado e intenso, causando alterações distintas nas respostas fisiológicas dos sistemas de defesa (Garber et al., 2011; Mcardle; Katch; Katch, 2008). A determinação do nível do exercício (leve, moderado ou intenso) é conseguida através de testes específicos. Para protocolarmos um programa de exercício, é necessária a realização de alguns testes como o de Lactato Mínimo, o qual corresponde a uma intensidade inferior ao ponto de inflexão da curva do limiar de lactato sanguíneo (De Araujo et al., 2007; Ferreira et al., 2007; Pirofski; Casadavel, 2009). Para ratos jovens, o exercício aeróbico moderado é considerado como sendo a utilização de uma carga de 5% do

peso corporal (PC) do animal. O exercício intenso/exaustivo pode gerar alterações imunossupressoras, modificações na concentração de leucócitos, incluindo células Natural Killer (NK) e linfócitos (Borbada et al., 2009; Nicklas; Brinkley, 2009), e diminuição na função antiviral dos macrófagos alveolares, aumentando a susceptibilidade a herpes simples e a infecções pulmonares (Nicklas BJ; Brinkley TE, 2009). Por outro lado, há uma forte associação entre o TF moderado e a melhora da capacidade imunológica dos indivíduos, muitas vezes idosos (Kadoglou NPE et al., 2011; Bortolon JR et al., 2012), trazendo resultados benéficos na prevenção e reabilitação de muitas doenças provocadas pelo envelhecimento, além de melhorar a resposta de defesa contra processos infecciosos, já que aumenta algumas funções celulares como quimiotaxia, desgranulação, fagocitose e atividade oxidativa dos neutrófilos (Bombarda J et al., 2009) e de macrófagos/monócitos (Batista Jr ML et al., 2009; Lyon JP et al., 2006). Ainda, o TF moderado tem sido associado ao aumento da expectativa de vida de animais portadores de tumores (Cunha VN et al., 2008; Oliveira CA et al., 2002), promovendo a inibição do crescimento tumoral e reduzindo o risco de vários tipos de câncer (Ferreira CKO et al., 2007).

Por meio de uma revisão sistemática, relatou-se que a utilização do TF moderado em pacientes com câncer levou a um aumento da atividade citotóxica de células NK, juntamente com uma maior proliferação dos linfócitos (Krujisen-Jaarsma M et al., 2013). Alguns estudos também transcrevem benefícios cardiovasculares, diminuindo assim a mortalidade e morbidade a partir de um protocolo de exercício físico progressivo (Schiattarella GG et al., 2014). A partir de um estudo realizado com ratos *Wistar*, utilizando um protocolo de carga moderada, concluiu-se que o exercício levou a um aumento significativo da capacidade fagocítica dos neutrófilos, porém não dos monócitos/macrófagos (Bherer; Erickson; Liu-ambrose, 2013).

O sistema imune também responde de forma diferente aos estímulos agudos (resposta fisiológica imediata após o TF – TF agudo) e àqueles crônicos (adaptação do corpo ao estresse gerado pelo TF – TF crônico ou regular). Durante ou instantes após o término da sessão de TF, há liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas e proteínas de fase aguda, bem como ativando o sistema complemento e os leucócitos (Bortolon et al., 2012; Taur et al., 2010). Estímulos agudos também melhoram as funções das células NK e a atividade fagocítica de

monócitos/macrófagos (Ewers; Rizo; Kalil Filho, 2008; Rogatto; Luciano, 2002). Entretanto, alguns trabalhos divergem nestes resultados, demonstrando que o TF agudo de alta intensidade aumenta o dano tecidual e o estresse oxidativo (Roque et al., 2011) e estimula a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1. Tais efeitos variam de acordo com a carga utilizada (Peake; Nosaka; Suzuki, 2005; Tanida et al., 2001).

Já o TF regular, realizado rotineiramente, de forma leve ou moderada, leva a uma adaptação, podendo minimizar ou reduzir o estresse imposto pela sessão aguda (Kadoglou et al., 2011; Taur et al., 2010). O TF moderado vem demonstrando, em diversos estudos, o potencial de reduzir parâmetros imunológicos importantes no desenvolvimento de patologias crônicas como diabetes mellitus, Alzheimer e aquelas relacionadas às alterações neurodegenerativas do envelhecimento (Gomes et al., 2013).

Através da adaptação que os sistemas orgânicos sofrem com o estresse imposto pelo TF, o corpo sofre diversas mudanças no sistema imune, com possível melhora de muitas funções celulares (Bacurau, 2007), como a atividade antitumoral e citotóxica de macrófagos e linfócitos. Estes resultados podem representar uma adaptação importante nos mecanismos de defesa (Walsh et al., 2011). Os resultados obtidos em estudos recentes demonstram que o EF regular é capaz de estimular o equilíbrio entre a produção das citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (Eyre; Papps, Baune, 2013) e das pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF (Gomes et al., 2013; Nunes et al., 2008).

Embora o mecanismo pelo qual o treinamento físico modifica a resposta imunológica seja desconhecido, acredita-se que a liberação de citocinas por células musculares, particularmente IL-6, regule a produção de mediadores inflamatórios por células mononucleares periféricas e interfira no metabolismo de tecidos e órgãos (Nieman; Pederson, 1999). Embora haja inúmeros estudos com protocolos de TF agudo, poucas informações existem sobre os efeitos do TF crônico sobre os mecanismos de defesa.

O envelhecimento representa uma complexa remodelagem dos sistemas do corpo, resultando em alterações numéricas e funcionais nas células imunes, o que torna os idosos mais susceptíveis a processos infecciosos e inflamatórios, bem com

a doenças cardiovasculares, aterosclerose, infartos e doenças coronarianas (Bruunsgaard; Pederson, 2000; Gomes; Gama 2007; Roque et al., 2011). Assim, é de suma importância uma maior investigação sobre os efeitos dos protocolos de exercícios físicos sobre o sistema imune comprometido pela idade, para que estes possam ser utilizados como uma forma de tratamento segura e não medicamentosa para a população geriátrica.

2.2 IMUNOSSENESCÊNCIA

O envelhecimento do sistema imune é denominado Imunossenescência, a qual é caracterizada por alterações quantitativas e/ou qualitativas em seus componentes celulares e moleculares, levando a um estado de inadequada atividade deste sistema (Dos Santos et al., 2010; Ferreira et al., 2007; Magliano 2012); em destaque, o aumento da atividade inflamatória basal definido como *inflammaging* (Bruunsgaard; Pederson, 2000). O termo *inflammaging* (inflammation + aging) é utilizado para designar uma sutil, porém sustentada, regulação positiva da resposta inflamatória, em idosos, de etiologia idiopática que contribui para o surgimento de doenças inflamatórias, podendo ser desencadeada pela desorganização da primeira linha de defesa, o sistema imune inato (Ewers; Rizzo; Kalil Filho, 2008)

A imunossenescência está associada a alterações na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, com aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-6 (Bruunsgaard; Pederson, 2000; Leandro et al., 2007). Os monócitos/macrófagos também apresentam alterações no envelhecimento, com diminuição numérica e na sua ativação, em comparação com a população jovem; porém existem resultados conflitantes, que podem ser atribuídos a fatores, tais como o gênero, a forma de obtenção dos macrófagos e as diferenças nas condições experimentais (Pereira et al., 2013).

Em relação aos monócitos, estudos in vitro evidenciaram que, durante o processo de envelhecimento, estas células elevam a produção de TNF- α e de INF- γ (Magliano et al., 2012). Entretanto, poucos estudos têm investigado a resposta funcional de fagócitos circulantes após treinamento físico em população idosa.

A deficiência na resposta pró-inflamatória dos idosos frente a uma agressão antigênica pode ser explicada por uma possível deficiência de resposta Th1, visto que os monócitos de idosos produzem menos IL-12 que os jovens (Pereira et al., 2013). Verificou-se ainda um perfil acentuado de citocinas Th2 nos idosos, apresentando uma maior produção de IL-10 em comparação com indivíduos jovens (Brito et al., 2011).

As alterações da imunossenescência propiciam menores respostas a imunizações, maior índice de fenômenos neoplásicos, degenerativos e autoimunes, bem como maior suscetibilidade a infecções, tornando os idosos mais susceptíveis a agentes agressores como, por exemplo, ao fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) e a bactérias como *Escherichia coli* (*E. coli*) (Pereira et al., 2013; Machado et al., 2006; Marques et al., 2012; Roque et al., 2011).

Em um estudo clínico prospectivo realizado em mulheres idosas, notou-se um aumento da prevalência de infecções urinárias, em grande parte dos casos causadas pela bactéria *E. coli*, relacionado com a diminuição da capacidade do sistema imunológico (Machado et al., 2006; Marques et al., 2012).

Pacientes acamados e que estão ou estiveram em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) apresentam um alto índice de infecção urinária através de bactérias Gram-negativas. Além da imunossenescência, vários fatores contribuem para o aumento da incidência de bacteriúria em pacientes idosos, acamados ou não, como o declínio significativo da função cognitiva, dificultando a higiene pessoal, bem como a incontinência fecal e urinária, e a desnutrição (Marques et al., 2012).

Comumente em indivíduos saudáveis, o fungo do gênero *Candida* é encontrado como organismo comensal, podendo colonizar superfícies mucosas do trato gastrointestinal e genitourinário feminino (Akpan; Morgan, 2002; dos Santos et al., 2010). Porém, em certas condições, o fungo pode tornar-se patogênico, causando processos inflamatórios e destruição tecidual (Oliveira; Rogatto; Luciano, 2002). Apenas 10% das espécies já encontradas (200 espécies) de *Candida* estão relacionados a doenças nos seres humanos, sendo a mais comum, *C. albicans* (Akpan; Morgan, 2002).

Alguns estudos relacionam aspectos da imunossenescência com a maior susceptibilidade às candidoses, mucosa e sistêmica (Ferreira et al. 2010), em função de alterações específicas como a diminuição da atividade candidacida por neutrófilos salivares e da fagocitose pelos neutrófilos sanguíneos, bem como a diminuição da produção de TNF- α pelos macrófagos e de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ (Gasparoto et al., 2009; Pirofski; Casadevall; 2009). A candidose tem sido considerada uma das principais causas de infecções em pacientes internados nos Estados Unidos, com alta mortalidade (Syu; Chen; Jen, 2011) durante a internação (Cakman et al., 1996).

Levando-se em conta o aumento da população idosa através dos anos, as alterações que o sistema imune sofre com a idade, resultando em maior suscetibilidade a doenças infecciosas, bem como o fato de que as práticas regulares de TF podem melhorar a função de células imunes, o presente trabalho teve o propósito principal de avaliar os efeitos do exercício físico regular aeróbico de nível moderado sobre a capacidade fagocítica dos macrófagos contra microrganismos.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito Treinamento Físico Moderado na resposta inflamatória de ratos idosos e jovens, com enfoque na atividade dos macrófagos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparando ratos *Wistar* idosos e jovens, pretendemos avaliar:

- o efeito de um protocolo de Treinamento Físico Aeróbio Moderado sobre a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais, após desafio com os microrganismos *Escherichia coli* e *Candida albicans*, e
 - a melhora da capacidade física dos ratos impostos ao protocolo de Treinamento Físico Aeróbio Moderado por oito semanas consecutivas.
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, obtidos e criados no Biotério Central da FOB-USP, jovens e idosos, com idade de 60 dias, e de 14 meses, respectivamente (Chang et al., 2011; De Araujo et al., 2010; Gasparoto et al., 2012), alimentados através de ração específica e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a condições apropriadas, sendo acomodados em gaiolas retangulares com capacidade para oito ratos. Porém, foram acomodados cinco ratos, em cada gaiola, para o grupo dos jovens, e dois para o grupo dos ratos idosos, para amenizar o estresse dos animais. Os animais foram colocadas em uma sala com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de claro e escuro (12/12 h).

Os animais foram divididos em 4 grupos, com 12 a 13 ratos por grupo, sendo 2 grupos constituídos por animais que não praticaram o protocolo de TF imposto (sedentários):

Grupo JS	Jovens Sedentários (n=13)
Grupo IS	Idosos Sedentários (n=12)
Grupo JT	Jovens Treinados (n=12)
Grupo IT	Idosos Treinados (n=12)

4.2 PROTOCOLO DE EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO REGULAR

Antes de iniciar o treinamento (protocolo), os animais passaram por um período de adaptação ao meio líquido (Figura 2), com exercícios graduais no período de duas semanas, sendo utilizados tempos e cargas iniciais mínimos (5, 15, 30 e 45 minutos) (Ferreira et. al., 2010), os quais foram aumentados progressivamente até atingir a carga e o tempo estabelecidos para o protocolo de oito semanas sequenciais de treinamento.

Os grupos treinados, tanto jovens quanto idosos, foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio moderado (Pirofski; Casadevall; 2009), composto de 45 minutos de natação, três vezes por semana, durante oito semanas sequenciais (Pires et al., 2002). O Grupo Jov/T realizou tal protocolo com uma carga de 5% do peso corporal (PC), a qual corresponde a uma intensidade inferior ao ponto de inflexão da curva do limiar de lactato sanguíneo (Bacurau et al., 2000; Ferreira et al., 2007; Pirofski; Casadevall; 2009), o que garante que o exercício tenha sido aeróbio e não anaeróbio. Caso houvesse um aumento exacerbado e não linear da concentração do lactato sanguíneo durante o aumento da carga de exercício, o metabolismo do animal modificaria-se para suportar a intensidade do exercício imposto, ou seja, utilizaria o metabolismo anaeróbio (Volotarelli; Mello; Gobatto, 2004).

Para os animais idosos, a fim de se obter um nível moderado de exercício físico (aeróbio), foi realizada uma adaptação do Teste sanguíneo de Lactato Mínimo (LCmin) a partir de De Araújo et. al., 2010, para encontrar o Limiar anaeróbio (Lan) nestes animais, definido como a carga de trabalho máxima, a partir da qual o lactato sanguíneo começaria a se acumular desproporcionalmente durante exercícios progressivos. Os animais idosos foram treinados com a média da carga obtida no teste inicial de LCmin, ou seja 0,56% do PC, sob a qual os valores de lactato sanguíneo foram inferiores àqueles referentes a curva do limiar (exercício de nível moderado). Todos os animais foram pesados semanalmente para correção da carga imposta referente ao seu peso.

Para a colocação da carga necessária, pesos de chumbo de pescaria foram acomodados em uma bolsa de tecido de algodão, a qual foi posicionada na parte posterior do tronco do animal através de uma cinta elástica (Figura 1). Os exercícios foram realizados em tanques cilíndricos com medida de 80 cm de diâmetro por 120 cm de altura, mantendo uma profundidade de água em torno de 50 cm de altura (Figura 2). A temperatura da água foi mantida em aproximadamente $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (Pirofski; Casadevall, 2009).

Para a comprovação da eficácia do protocolo utilizado, foi realizado o Teste de LCmin na maior parte dos animais, no primeiro e no último dia de treinamento (De Araujo et al., 2010; Tanida et al., 2001) (Figura 3).

Figura 1- Bolsa de tecido de algodão para a colocação dos pesos de chumbo.

Figura 2 - Configurações do tanque utilizado para o protocolo de exercício aeróbio (A). Em B, observam-se os pesos de chumbo utilizados para a obtenção das cargas, e em C encontra-se a imagem representativa do tanque utilizado durante os dias de adaptação dos animais ao meio líquido.

4.3 AVALIAÇÃO DA APTIDÃO FÍSICA DOS ANIMAIS

Para a comprovação da eficácia do protocolo utilizado, foi realizado o Teste de LCmin na maior parte dos animais, no primeiro e no último dia de treinamento (De Araujo et al., 2010; Tanida et al., 2001) (Figura 3).

Para os animais idosos, a fim de se obter um nível moderado de exercício físico (aeróbio), foi realizada uma adaptação do Teste sanguíneo de Lactato Mínimo (LCmin) a partir de De Araújo et. al., 2010, para encontrar o Limiar anaeróbio (Lan) nestes animais, definido como a carga de trabalho máxima, a partir da qual o lactato sanguíneo começaria a se acumular desproporcionalmente durante exercícios progressivos.

Figura 3 - Semanas demarcadas para a realização dos testes de lactato mínimo, ao longo do período de adaptação e do protocolo de exercício físico aeróbio (natação por oito semanas), totalizando dez semanas. O primeiro teste (1º LCmin) foi executado no início da terceira semana (primeira semana do protocolo de exercício) e o Teste final (LCmin Final) no último dia da décima semana.

O teste de LCmin constituiu em uma indução primária a hiperlactatemia, por meio de um protocolo de natação com uma carga de 13% do PC com 30 segundos de exercícios e 30 segundos de recuperação e em seguida até sua exaustão, ou seja, o momento em que o animal tornou-se incapaz de permanecer por 10 segundos na superfície da água. Após esta exaustão, os animais foram transferidos para uma caixa plástica com pequeno volume de água a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, e permaneceram em repouso por 9 minutos sob águas rasas. Durante o período de recuperação, aos 5º, 7º e 9º minutos, amostras de sangue venoso (25 µl) foram coletadas em tubos capilares de vidro contendo heparina, a partir da veia caudal, e adicionadas em microtubos contendo 50 µl de fluoreto de sódio a 1% (Figura 4) (De Araujo et al,

2010; Tanida et al, 2001). Após este repouso, os animais retornaram ao tanque cilíndrico para a realização do protocolo de natação de carga progressiva, cuja carga inicial foi de 4% do PC sendo aumentada em 1% a cada 5 minutos, chegando a 7% do PC.

Para os animais idosos, o protocolo foi modificado devido a incapacidade de realizarem o teste padrão estipulado pela literatura. Para isso, foram realizados testes piloto para se obter o tempo necessário de repouso para se atingir o pico de lactato após a indução com carga alta. Após os testes, foi estipulado uma carga de 11% para os animais idosos. Após o período de indução primária a hiperlactatemia, os animais idosos foram transferidos para uma caixa plástica com pequeno volume de água a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, e permaneceram em repouso por 13 minutos sob águas rasas. Durante o período de recuperação, aos 7°, 9°, 11° e 13° minutos, amostras de sangue venoso (25 µl) foram obtidas e os animais retomaram ao tanque para a realização do teste de carga progressiva, também adaptado através de testes piloto. Assim, a carga inicial foi 0% (sem peso) e a carga final foi de 4% do PC. Antes do início do protocolo de exercício de carga progressiva e a cada aumento de intensidade da carga, amostras sanguíneas também foram coletadas.

4.4 ANÁLISE DO LACTATO SANGUÍNEO

Todas as amostras sanguíneas foram dosadas em analisador de lactato YSI2300 (Yellow Spring Instruments, Yellow Spring, Ohio, USA), alocado nas dependências da UNESP, Campus Bauru (Figura 4). O aparelho foi calibrado antes e após 5 leituras, com um padrão de 5 mmol/L de lactato, conforme indicação do fabricante. A curva de lactato sanguíneo vs carga de trabalho, para cada rato, determinada no teste, foi obtida por teste polinomial de grau 2, com auxílio do programa de computador Microsoft Office - Excel®. Assim, encontrou-se a determinação matemática, pela análise da função do menor valor de concentração de lactato e sua respectiva carga de trabalho, definindo-se assim a Lan (Figura 5).

Figura 4 - Aparelho utilizado para análise do lactato sanguíneo (A). Microtubo com 50 μ l de fluoreto de sódio a 1% após a coleta de 25 μ l de sangue (B) Tubos capilares de vidro contendo heparina, utilizados para a coleta de sangue dos animais.

Figura 5 - Representação da curva de lactato sanguíneo vs carga de trabalho, obtida após a realização do teste de LCmin em um dos animais idosos. As curvas foram obtidas através de um ajuste polinomial de grau 2, com o auxílio do programa de computador Excel. As equações que definem as curvas encontradas possibilitaram o cálculo das menores concentrações de lactato sanguíneo e das respectivas cargas de trabalho. Lan: $y = 0,6546x^2 - 1,9227x + 10,361$ (1,5% do PC). A seta indica o maior valor de carga de trabalho (em relação ao PC) suportada antes de atingir a transição metabólica para a via glicolítica (curva ascendente).

4.5 PESAGEM DOS ANIMAIS

Para utilização específica da carga em relação ao PC, os animais foram submetidos semanalmente a pesagens, sendo realizadas todo primeiro dia de protocolo da semana totalizando oito pesagens, até a ultima semana de exercício. As pesagens foram realizadas em uma balança digita (Filizola®), alocada na sala de cirurgia do Biotério Central da FOB-USP. Para tal, os animais eram acomodados em caixas, sendo subtraído o valor do peso das caixas (700 gramas) do valor total obtido na pesagem.

4.6 PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS DOS MICRORGANISMOS

Para os ensaios de fagocitose dos macrófagos, foram utilizadas leveduras do fungo *C. albicans* SC 5314, gentilmente cedidas pelo laboratório Especial de Microbiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O preparo do inóculo foi realizado da seguinte maneira: as células mantidas a -80°C foram semeadas em placas contendo meio de cultura YEPD (Yeast Peptone Dextrose) e incubadas a 37°C por 24 h em estufa bacteriológica. Uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YEPD e mantida em incubadora com agitação, para permitir o crescimento. Foram feitas lavagens sucessivas da suspensão, através da centrifugação. Após o processo de purificação das células, estas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas à concentração de 1×10^7 células/mL.

A bactéria *E. coli* O:124 utilizada foi fornecida pelo Prof. Dr. Mario Julio Avila-Campos, do Laboratório de Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Para a obtenção do inóculo, a suspensão bacteriana foi semeada em uma placa contendo meio de cultura de BHI ágar, incubada a 37°C por um período de 24 h, em estufa bacteriológica. Em seguida, uma única colônia foi ressuspensa em BHI caldo e mantida em estufa a 37°C *overnight*. A suspensão obtida foi centrifugada e lavada, o sobrenadante foi desprezado e substituído por PBS pH 7,2. Através da comparação da turbidez do inóculo com padrão 0,5 da escala de MacFarland em espectrofotômetro (600 nm), a concentração do inóculo foi padronizada e ajustada a 1×10^7 células/mL.

4.7 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Ao fim do protocolo de treinamento, os ratos passaram por um período de 48 horas de repouso, para eliminar a resposta aguda do animal frente à última sessão do TF realizado. Após esse período, os animais foram sacrificados através de dose excessiva de anestésico, utilizando uma associação de quetamina e xilazina (0,5mL/kg). Os animais sedentários foram sacrificados da mesma maneira, uma semana após o sacrifício dos animais treinados.

Após a morte, o abdome foi umedecido, a pele removida e a musculatura abdominal pinçada e erguida. Em seguida, foram injetados 30 mL de solução salina tamponada com fosfato pH 7,2, no peritônio do animal. Utilizando-se pipeta Pasteur, o líquido peritoneal foi coletado, adicionado em um tubo de ensaio e centrifugado por 1 minuto a 2000 rpm até que formar o *pellet*; na sequência, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspensionado e misturado ao corante Vermelho Neutro.

Após contagem em câmara de Neubauer, a concentração das células foi ajustada a 1×10^6 células/mL e mantidas *in vitro overnight* para aderência. Através de demarcações realizadas sobre a penugem, foi possível a obtenção e a avaliação individualizada de cada animal experimental.

4.8 ENSAIO DE FAGOCITOSE

Para o desafio, as leveduras de *C. albicans* SC 5314, bem como os bacilos de *E. coli*, foram mortos pelo calor, por meio de autoclave vertical a 121°C por 30 minutos, e incubados com FITC por 1 e 3 horas, respectivamente, em incubadora com agitação a 37°C e 75 rpm. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 5000 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente, e ressuspensionados em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) completo.

Na sequência, os microrganismos foram adicionados aos macrófagos (proporção 1/20), acomodados nas placas de cultura, para proporcionar os desafios a 30 e 120 min, a 37° C com agitação de 75 rpm (Figura 5). Após, a placa foi lavada com RPMI simples e a fluorescência quelada com Azul de Tripán 1% por 30 min a temperatura ambiente. Na sequência, foram feitas lavagens com PBS (500 µL por

poço) para remoção do excesso de corante e fixação por meio de paraformaldeído (PFA) a 2% (500 µL por poço).

A atividade fagocítica foi avaliada qualitativamente e quantitativamente por meio do microscópio de fluorescência Axiostar HBO plus 50/AC (Zeiss, Alemanha), no aumento de 100x, contando-se os macrófagos com *C. albicans* ou *E. coli* internalizados ou não, a partir de 25 campos consecutivos. A partir do número total de células contadas, o percentual de microrganismos internalizados foi obtido para cada grupo, nos diferentes tempos de desafio.

Figura 6 - Ensaio de fagocitose, por meio do desafio de macrófagos peritoneais, acomodados em placas de cultura, com *Candida albicans*.

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a obtenção dos resultados, os dados foram submetidos à análise de critério de normalidade, apresentando $p < 0,05$, como à homogeneidade de variância (ANOVA one-way). A partir do teste ANOVA, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os quatros parâmetros avaliados (Grupo, Animais, Bactérias e Tempo); consequentemente foi aplicado o teste paramétrico de Tukey HSD a quatro critérios, possibilitando assim a comparação entre os grupos (IS vs JS e IT vs JT) e a determinação das diferenças significativas.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MELHORA DO CONDICIONAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS ATRAVÉS DO TESTE DE LACTATO MÍNIMO (LCmin).

Embora os valores de lactato sanguíneo, após 8 semanas de TF (média de 0,93%), tenham sido superiores em comparação àqueles referentes ao início do TF (média de 0,56%), não houve diferença significativa considerando os respectivos períodos, iniciais e finais, tanto para os jovens quanto para os idosos. A Figura 6 exemplifica os valores iniciais e finais de um único animal idoso, demonstrando uma grande melhora do seu condicionamento físico após o protocolo de TF realizado, ou seja, o limiar anaeróbio inicial de aproximadamente 0,4% aumentou para 1,5% do PC após o TF (limiar anaeróbio final).

Vale ressaltar que apesar de não apresentar uma diferença estatisticamente significativa no LAN, o protocolo de exercício físico imposto demonstrou eficácia no ganho de condicionamento físico dos animais, sendo idosos ou não. Observou-se que, no final do protocolo de exercício, os ratos apresentaram uma capacidade de executar o mesmo exercício, porém com uma carga (em gramas) superior em relação àquela inicial. No teste inicial, o limiar anaeróbio apresentou uma média de $0,56\% \pm 0,7$ do PC, para os ratos idosos, e $5,18\% \pm 1,44$ para os jovens. Após o protocolo de TF, os testes finais de LCmin apresentaram valores médios de $0,93\% \pm 0,47$ do PC, para os ratos idosos, e $5,88\% \pm 0,4$ para os jovens (Tabela 1). Estes valores demonstraram que os animais idosos, após o TF, melhoraram em aproximadamente 65% sua capacidade de suportar uma carga imposta durante um protocolo de TF moderado; enquanto que os jovens apresentaram uma melhora de aproximadamente 14%. Para ambos os grupos, notou-se uma melhora substancial na capacidade física após as oito semanas de treinamento.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do limiar anaeróbio em % de Pc obtidos antes e depois de oito semanas de treinamento físico aeróbio**Ratos Idosos Sedentários**

Ratos	Inicial	Final
Jovens	5,18%±1,44	5,88%±0,4
Idosos	0,56%±0,7	0,93%±0,47

5.2 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Observou-se que, após as oito semanas do protocolo experimental de exercício físico aeróbio, o peso final (média de 395 g) dos animais idosos treinados foi semelhante àquele obtido imediatamente antes do início do treino (média de 393,9 g) (Figura 7 e Tabela 2 - Anexo A). Em contrapartida, os animais idosos sedentários (IS), em um período de oitos semanas, apresentaram um ganho de peso, ou seja, de 393,9 g (média), o peso foi para 458,10 g (média) (Tabela 3 – Anexo A). Este valor do peso ganho foi significativamente maior em relação ao peso dos idosos após o treino por oito semanas (Figura 7).

Diferente dos idosos, os animais jovens, após o treino imposto de oito semanas (JT), apresentaram um aumento significativo em seu peso corporal. Imediatamente antes do início do treino, o peso médio destes animais foi 237,4 g e, na última semana, foi 331 g (Tabela 4 – Anexo A) . Da mesma forma, os animais jovens sedentários (JS) apresentaram um ganho de peso no período de oito semanas (média de 380 g) (Figura 7). Possivelmente, este ganho de peso, independente do treino, representa a evolução natural do desenvolvimento destes animais.

Figura 5 - Peso corporal dos animais, idosos e jovens, obtido semanalmente, durante o período de oito semanas, com (IT e JT, respectivamente) ou sem (IS e JS) a realização do protocolo experimental de exercício físico aeróbio. * $p < 0,05$, comparando-se com o peso inicial, dentro de cada grupo (Teste t pareado) [#] $p < 0,05$, comparando-se com o peso final do grupo IT (Teste t não pareado - IT vs IS e JT vs JS); N = 13 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 13 para JS.

5.3 ANÁLISE DA FAGOCITOSE PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Após desafio in vitro com *C. albicans*, os macrófagos peritoneais (corados com seus núcleos em azul) apresentaram os microrganismos (corados em verde) no seu interior. Nos jovens, a grande maioria demonstrou até três leveduras internalizadas, enquanto os idosos apresentaram geralmente mais de três microrganismos no interior de seus macrófagos (Figura 8).

Após desafio com as bactérias *E. Coli*, nos dois períodos avaliados, a grande maioria dos macrófagos peritoneais, principalmente quando oriundos dos animais idosos, apresentou alterações morfológicas dos seus núcleos, sugestivas de processo de apoptose (Figura 9). Em especial aos 120 minutos, havia também células mortas. Estes aspectos foram raros quando as células foram desafiadas com *C. albicans*.

Em comparação aos jovens, após os tempos de desafio in vitro com os microrganismos, notou-se uma maior quantidade de células aderidas nas lâminas, quando as mesmas eram obtidas dos animais idosos.

Figura 6 - Macrófagos peritoneais (com seus núcleos corados em azul – DAPI), obtidos de animais jovens (A, D, E e F) ou idosos (B e C), após desafio in vitro por 30 (A, C e D) e 120 (B, E e F) minutos, apresentando fungos *C. albicans* (A, B e C) ou *E. coli* (D, E e F) internalizados (corados em verde – FITC) (microscopia de fluorescência).

Figura 7 - Macrófagos peritoneais (com seus núcleos corados em azul – DAPI) com bactérias *E. coli* (A, B e D) ou fungos *C. albicans* (C) internalizados (corados em verde – FITC), após desafio in vitro por 30 (A e D) e 120 (B e C) minutos. As setas brancas apontam núcleos alterados morfológicamente, sugestivo de processo de apoptose; as setas laranjas apontam para fragmentos nucleares, sugerindo corpos apoptóticos (microscopia de fluorescência).

Comparação entre grupos Treinados e Sedentários

Ratos Idosos

Após oito semanas do protocolo de TF, o percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, obtidos a partir dos ratos idosos, foi maior ($p < 0,05$) em relação aos animais sedentários. Estes achados foram verificados tanto após desafio com bactérias *E. coli* quanto com fungos *C. albicans*, e independente do período de desafio (Figura 10 e Tabela 4 - Anexo A). Vale ressaltar que os valores obtidos em 120 minutos foram superiores que aqueles correspondentes aos 30 minutos de desafio.

Figura 8 - Percentual de macrófagos com microrganismos internalizados, *C. albicans* ou *E. coli*, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre sedentários e treinados. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey HSD); N = 12 para IT, N = 12 para IS.

Ratos Jovens

Após oito semanas de TF, os ratos jovens demonstraram um maior percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, *C. albicans* ou *E. coli*, em comparação àqueles obtidos dos ratos jovens sedentários, independente dos tempos de desafio ($p < 0,05$). Entretanto, aos 120 minutos, os valores percentuais foram superiores àqueles correspondentes aos 30 minutos (Figura 11 e Tabela 4 - Anexo A)

Figura 9 - Percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, *C. albicans* ou *E. coli*, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre sedentários e treinados. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey); N = 13 para JT e N = 12 para JS.

Observou-se uma maior porcentagem de células com internalização de microrganismos no desafio de 120 minutos, tanto para os ratos idosos como para os jovens, sendo treinados ou não, em comparação aos 30 minutos. Por outro lado, comparando-se os dois microrganismos (*C. albicans* e *E. coli*), dentro das mesmas condições (idade, tempo de desafio, treinados ou não), a porcentagem de internalização foi similar.

Comparação entre grupos etários

Após oito semanas do protocolo de TF estipulado, os valores percentuais de macrófagos com microrganismos internalizados eram maiores entre os idosos que aqueles observados entre os jovens, independente do período de desafio in vitro ($p < 0,05$). Estas diferenças etárias também ocorreram entre os animais sedentários. As Figuras 12 e 13 revelam estes achados, para o fungo *C. albicans* e para a bactéria *E. coli*, respectivamente (Tabela 5 - Anexo A).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando os diferentes microrganismos foram comparados.

Figura 10 - Percentual de macrófagos peritoneais com fungos *C. albicans* internalizados, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre jovens e idosos. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey); N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS.

Figura 11 - Percentual de macrófagos peritoneais com bactérias *E. coli* internalizadas, após 30 e 120 minutos de desafio in vitro, com enfoque na comparação entre jovens e idosos. * $p < 0,05$ (Anova One-way e Teste de Tukey HSD); N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS.

Para a obtenção destes resultados, os dados foram submetidos à análise de critério de normalidade, apresentando $p < 0,05$, como à homogeneidade de variância (ANOVA one-way). A partir do teste ANOVA, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os quatro parâmetros avaliados (Grupo, Animais, Bactérias e Tempo); consequentemente foi aplicado o teste paramétrico de Tukey HSD a quatro critérios, possibilitando assim a comparação entre os grupos (IS vs JS e IT vs JT) e a determinação das diferenças significativas.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento está associado a diversas alterações sistêmicas, como, por exemplo, um progressivo declínio do sistema imunológico (Qian et al, 2014), conhecido como Imunossenescência, um mecanismo fisiológico caracterizado pela diminuição da capacidade funcional das células imunes e pela desregulação na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, aumentando a susceptibilidade a infecções bacterianas e a doenças crônicas como a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistêmico e o diabetes mellitus (Oliveira et al, 2011; Palmer, 2013).

Associado a imunossenescência, com a idade avançada ocorre também uma diminuição das atividades de vida profissional (AVP's) bem como de vida diária (AVD's), muitas vezes associada com uma alimentação não equilibrada (Qian et al, 2014; Gholamnezhad et al, 2014), o que pode resultar em um grande risco para o desenvolvimento de doenças crônicas (Zhang et al, 2014).

O sedentarismo, na idade avançada, torna-se um fator adicional no prejuízo da qualidade de vida e tem sido relacionado a diversas alterações sistêmicas (Thawornchaisit et al, 2013), tais como a diminuição funcional do tecido muscular, o que gera redução da força e da resistência, a diminuição da capacidade cardiorrespiratória (Warburton, Nicol, Bredin, 2006; Department of Health, 2011; Solomon et al, 2013) e das funções do sistema imunológico (Ferreira et al, 2007; Abdalla et al, 2014).

Inúmeros estudos, incluindo no âmbito clínico, revelaram que o exercício físico traz uma melhora da saúde geral, resultando, através de uma rotina protocolada e executada de forma correta, benefícios na função de inúmeros sistemas orgânicos. Dentre estes benefícios, destaca-se a melhora nas funções cardiovasculares, com manutenção da pressão arterial, nas funções vasculares, com melhor aporte de O₂ para os tecidos, nas funções musculoesqueléticas, como força, resistência e mobilidade, e nas funções pulmonares. Ainda, o TF pode estar associado, além da manutenção do peso corporal, com a manutenção de taxas adequadas de triglicerídeos e colesterol, e com o aumento da densidade óssea, muitas vezes prevenindo alterações metabólicas e inflamações crônicas,

comumente encontrada em indivíduos obesos. Assim, o TF pode colaborar na prevenção de doenças como a diabetes mellitus e a aterosclerose (American College of Sports Medicine Position Stand, 2011; Batterham et al, 2014; Gomes et al, 2013).

A melhora da capacidade física, obtida com o TF, pode ainda estar diretamente relacionada com a melhora do sistema imunológico, visto que diversos estudos demonstraram uma melhora das funções celulares após protocolos de exercícios físicos, como a manutenção do comprimento dos telômeros, estruturas responsáveis pela proteção dos cromossomos e que, ao passar dos anos, apresentam uma diminuição de seu comprimento. Já que os telômeros tendem a reduzir o comprimento progressivamente com o tempo, eles têm sido considerados marcadores de senescência. Diversas doenças crônicas são decorrentes da diminuição do comprimento dos telômeros e, inversamente, a manutenção dos mesmos sustenta a função considerada ideal para o sistema imunológico (Bombarda et al, 2009; Chilton et al).

Exercícios físicos foram ainda relacionados com a melhora na produção e na liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, e com a diminuição da produção e da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α (Bombarda et al, 2009; Ferreira et al, 2010; Huang et al, 2013;). Jia et al (2014) sugerem que o equilíbrio na produção de citocinas anti e pro-inflamatórias, obtido após o treinamento físico, é um importante mecanismo capaz de atenuar patologias crônicas, como a hipertensão e a hipertrofia cardíaca (Jia et al, 2014).

Considerando o efeito positivo do exercício físico (TF) sobre o funcionamento do sistema imune, o presente estudo teve como propósito verificar se um protocolo semanal de exercício físico moderado aeróbio aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais. Uma vez que o envelhecimento resulta em declínio do sistema imunológico, propusemo-nos ainda a comparar quantitativamente o efeito deste protocolo de TF entre animais idosos e jovens. A capacidade fagocítica foi avaliada in vitro, após desafios com a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) ou com o fungo *Candida albicans* (*C. albicans*).

Ambos microrganismos estão comumente associados com infecções oportunistas, principalmente em idosos acamados por longos períodos, como por

exemplo infecções urinárias por *E. coli* (Marques et al, 2012) e candidoses mucosas ou sistêmicas (Ferreira et al, 2010). A candidose é considerada a maior causa de infecção nas Unidades de Terapias Intensivas (UTI), nos EUA (Syu; Chen; Jen, 2011).

Independente da idade, exercícios físicos realizados em três dias, durante a semana, têm demonstrado resultados benéficos, como a melhora da capacidade cardiovascular (Ogihara et al, 2014) e dos parâmetros musculoesqueléticos como força e resistência, aumentando a capacidade funcional do indivíduo (American College of Sports Medicine Position Stand, 2011; American Geriatrics Society Panel on Exercise and Osteoarthritis, 2001). Por esta razão, no presente trabalho, utilizamos um protocolo de exercício físico baseado em natação, três dias por semana, durante oito semanas sequenciais. Porém, outros trabalhos, envolvendo protocolos de TF em animais, realizaram exercícios diários, de cinco a seis vezes por semana (Bacurau et al, 2007; Gholamnezhad et al, 2014).

Vale ressaltar ainda que um protocolo de, no máximo, três dias por semana aumenta a chance de inserção de indivíduos sedentários em programas de exercícios terapêuticos, focados na qualidade de vida e na melhora da saúde geral. Atualmente, o cotidiano torna-se cada vez mais preenchido por atividades laborais e compromissos pessoais, dificultando ou impossibilitando uma dedicação diária aos exercícios.

Visto que existe uma relação direta entre o envelhecimento, o sedentarismo e alterações funcionais do sistema imunológico (Montoya-Ortiz, 2013; Eyre; Papps; Baune, 2013), torna-se de suma importância disponibilizarmos estratégias acessíveis, atrativas e de baixo custo, que proporcionem facilidade de inclusão ao TF, em especial para os idosos, o que somaria AVD's a sua rotina.

Além destas vantagens, o protocolo de TF, utilizado por nós, resultou em importante controle do peso corporal (PC) tanto nos animais jovens quanto nos idosos, assim como observado por Cunha et al (2008), demonstrando a eficácia dos exercícios físicos na saúde geral destes animais, já que o aumento de peso pode predispor ao desenvolvimento de diversas patologias crônicas ou disfunções sistêmicas metabólicas como a diabetes mellitus tipo 2, doenças hepáticas não alcoólicas, dislipidemia e hipertensão (Enos et al, 2014; Jung; Choi, 2014).

Os estudos, sobre os efeitos do TF nas funções imunes, não se propuseram a verificar se o protocolo de TF imposto de fato melhorou a capacidade física dos animais, o que poderia explicar as alterações funcionais de células imunes observadas após os diversos protocolos de TF, muitas vezes melhorando o sistema de defesa orgânica (Bombarda et al, 2009; Ferreira et al, 2010). Além disso, um protocolo experimental de TF com a comprovação do aumento da capacidade física torna-se mais eficaz, seguro e reprodutível, fortalecendo a influência do TF na saúde destes animais.

Embora nossos resultados tenham sido similares, comparando-se os testes de LCmin no início e no final do protocolo de TF, os animais obtiveram uma melhora expressiva em sua capacidade de realizar o exercício físico moderado, sendo de 14% entre os jovens e 64% entre os idosos. De fato, foi possível observar uma melhora no nado dos animais, através de uma avaliação visual subjetiva. Durante as últimas semanas do protocolo de TF, os animais, independente da idade, praticavam o nado mais continuamente e com maior facilidade que no início, ou seja, com menor frequência de submersão na água para descanso.

De forma semelhante, De Araujo et al (2010) não observaram melhora nos valores de LCmin no final do protocolo de TF utilizado em animais, porém detectaram melhora da capacidade aeróbia por meio do teste de tempo de nado até exaustão (Tlim), o qual se baseia na contagem do número de atividades de nado subsequentes, com carga de 13% do PC por 30 segundos. Estas atividades, intercaladas por descanso de 30 segundos, são repetidas até a exaustão (De Araujo et al, 2010). Com o objetivo de avaliar a sensibilidade dos testes utilizados para quantificar a capacidade física dos animais, Voltarelli et al (2004) concluíram que o teste de LCmin pode ter limitações quando usado em animais, diferentemente de humanos. Assim, é possível que o protocolo utilizado não seja tão sensível às alterações físicas e metabólicas que ocorrem em ratos após o TF.

Nossos resultados in vitro demonstraram alterações importantes em células do sistema imunológico, após um protocolo de TF com comprovada melhora da capacidade física. Os animais treinados apresentaram uma maior porcentagem de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, *C. albicans* ou *E. coli*, em comparação aos sedentários, independente da idade. Os valores percentuais

elevaram, nos animais treinados em relação aos sedentários 60% entre os jovens e 40% entre os idosos. Alterações semelhantes foram encontradas por Bherer, em (2013), e por Meneguello Coutinho et al, (2014), após protocolos experimentais contínuos de TF, bem como por Bombarda et al, (2009), após a utilização de uma única sessão de exercício físico. Nossos achados corroboram ainda o estudo de Ferreira et al, em 2010, utilizando zimosan; entretanto, a melhora na capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais foi menor que a observada por nós, em torno de 9%.

Baseando-se em nossos resultados, consideramos, portanto, que o treinamento físico moderado por oito semanas resultou em alteração da resposta dos macrófagos frente aos microrganismos, em animais, independente da idade. Provavelmente, isto pode representar uma maior capacidade ou eficiência em fagocitar a bactéria *E. coli* e o fungo *C. albicans*, atingida após o melhora da capacidade física.

Vale ressaltar que os estudos publicados utilizaram-se de protocolos de TF variados e distintos, com períodos de treinamento diferentes (3,5 até 6 vezes na semana) e com tempos de execução do treinamento distintos (30, 45 e 60 minutos), além de períodos totais mais prolongados ou mais breves, mesmo que na mesma intensidade (Bombarda et al, 2009; Ferreira et al, 2010; Gomes da Silva et al, 2013). Esta variabilidade de protocolos de TF em animais revela uma ausência de padronização em estudos envolvendo o efeito do TF no sistema imune, e ainda dificulta a comparação dos nossos resultados com outros realizados por equipes distintas. Ainda, não foram encontrados estudos que abordem a melhora do sistema imunológico após TF, comparando animais jovens e idosos.

Considerando que o envelhecimento está associado com um declínio funcional do sistema imunológico (dos Santos et al, 2010; Ferreira et al, 2007), nossos resultados comparando as diferentes faixas etárias foram surpreendentes. Os macrófagos oriundos dos animais idosos apresentaram maior porcentagem de fagocitose de microrganismos (*E. coli* e *C. albicans*), nos dois períodos de desafio, em comparação aos jovens, independente da realização de TF. Esta maior capacidade fagocítica, observada entre os idosos, pode representar uma maior

capacidade de defesa frente aos microrganismos *E. coli* e *C. albicans*, em comparação aos jovens. Porém, esta conclusão requer estudos adicionais in vivo.

Possivelmente, os macrófagos peritoneais oriundos dos idosos estão pré-ativados, já que há, com a idade, um aumento na produção e na liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este aumento está inserido em um processo fisiológico reconhecido durante o envelhecimento e denominado *Inflammaging*. O conceito *Inflammaging* é recente no âmbito da ciência gerontológica e a nomenclatura foi caracterizada em 2007 por Franceschi e colaboradores para representar um conjunto de alterações fisiológicas da imunossenescência (Giunta et al, 2008). Em resposta ao grande desequilíbrio na liberação de citocinas pró-inflamatórias, o estado *Inflammaging* é caracterizado por aumento exacerbado da resposta imune inata por células mononucleares e aumento da atividade dos fagócitos, gerando um estado inflamatório crônico (Giunta et al, 2008; Goto, 2008; Rocha; Reis; Teixeira, 2010).

Embora, a partir dos nossos resultados, os animais idosos tenham demonstrado valores maiores de internalização que os jovens, o que pode representar um benefício resultante do *Inflammaging*, é importante ressaltar que este estado fisiológico na senilidade tem sido associado com uma maior vulnerabilidade às agressões de origem interna e externa (Ewers; Rizzo; Kalil Filho, 2008) e com a ocorrência de patologias características dos idosos. A detecção sorológica de suas características pode ser um fator de prognóstico para tais patologias ou até mesmo para a morbidade nessa faixa etária (Rocha; Reis; Teixeira, 2010).

Em suma, de acordo com nossos resultados, o protocolo de exercício físico moderado (natação), realizado três dias por semana, trouxe benefícios não apenas entre os jovens, mas também entre os idosos. Este protocolo resultou em controle do peso corporal e em alteração funcional do sistema imunológico; em particular, em aumento da capacidade de fagocitose pelos macrófagos. Assim, acreditamos que o TF, dentre várias vantagens, pode representar também uma importante estratégia para complementar a terapêutica clínica contra diversas doenças que acometem grande parte da população idosa.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o treinamento físico aeróbio, realizado no nível moderado em por oito semanas, resultou em alteração funcional de macrófagos peritoneais, aumentando sua capacidade de internalização, independente da faixa etária destes animais. Isso pode sugerir que após um período de exercício, os macrófagos tornaram-se mais eficientes no combate aos microrganismos desafiados, *C. albicans* e *E. coli*.

O protocolo imposto também contribuiu para a melhora da capacidade aeróbia dos animais, podendo sugerir uma correlação entre as alterações funcionais observadas nos macrófagos, após o treinamento físico, com a maior capacidade aeróbia.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abdalla DR, Aleixo AA, Murta EF, Michelin MA. Innate immune response adaptation in mice subjected to administration of DMBA and physical activity. *Oncol Lett.* 2014;7(3):886-890.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J.* 2002;(922):455-9.

American College of Sports position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(7):1334-59

American Geriatrics Society on Exercise and Osteoarthritis. Exercise prescription for older adults with osteoarthritis pain: consensus practice recommendations. A supplement to the AGS Clinical Practice Guideline on the management of chronic pain in older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2001;49(6):808-23.

Bacurau AV, Belmonte MA, Navarro F, Moraes MR, Pontes FL Jr, Pesquero JL, Bacurau RF. Effect of a high-intensity exercise training on the metabolism and function of macrophages and lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats. *Exp Biol Med.* 2007;232(10):1289-99.

Bacurau RF, Belmonte MA, Seelaender MC, Costa Rosa LF. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct.* 2000;18(04):249-58.

Batterham AM, Bonner S, Wright J, Howell SJ, Hugill K, Danjoux G. Effect supervised aerobic exercise rehabilitation on physical fitness and quality-of-life in survivors of critical illness: an exploratory minimized controlled trial.

Batista Jr ML, Santos RVT, Oliveira EM, Seelaender MCL, Costa Rosa LFBP. Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. *J. Appl. Physiol* 2007; 102: 2033-2039.

Batista Jr ML, Lopes RD, Seelaender MCL, Lopes AC. Efeito anti-inflamatório do treinamento físico na insuficiência cardíaca: Papel do TNF- α e da IL-10. *Arq Bras. Cardiol.* 2009; 93(6):692-700.

Bherer L, Erickson KI, Liu-Ambrose T. Physical Exercise and Brain Functions in Older Adults. *J. Aging Res.* 2013; ID 197326 pag. 1-2.

Bombarda J, Melo CJ, Souza ER, Nóbrega OT, Córdova C. Exercício abaixo do limiar anaeróbio aumenta as atividades fagocítica e microbicida de neutrófilos em ratos *Wistar*. *J. Bras. Patol Med Lab.* 2009;45(1): 9-15.

Bortolon JR, Silva Junior AJ, Murata GM, Newsholme P, Curi R, Pithon-Curi TN, Hatanaka E. Persistence of inflammatory response to intense exercise in diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012(213986):1-8.

Bruunsgaard H, Pedersen BK. Effects of exercise on the immune system in the elderly population. *Immunol Cell Biol.* 2000; 78:523-531.

Brito CJ, Volp ACP, Nóbrega OT, Silva Jr FL, Mendes EL, Roas AFCM, Barros JF, Córdova C. Exercício físico como fator de prevenção aos processos Inflamatórios decorrentes do envelhecimento . *Motriz: Ver. Educ. Fís.* 2011; 3(17):544-55.

Cakman, I., Rohwer, J., Schutz, R.M., Kirchner, H., Rink, L. 1996. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. *Mech. Ageing Dev.* 87, 197-209.

Chang R, Greene T, Chenoweth CE, Kuhn L, Shuman E, Rogers MA, Saint S. Epidemiology of hospital-acquired urinary tract-related bloodstream infection at a university hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32(11):1127-9.

Chilton WL, Marques FZ, West J, Kannourakis G, Berzins SP, O'Brien BJ, Charchar FJ. Acute exercise leads to regulation of telomere-associated genes and microRNA expression in immune cells. *PLoS One.* 2014 Apr 21;9(4).

Cunha VN, Cunha RR, Segundo PR, Moreira SR, Simões HB. Treinamento de natação na intensidade do limiar anaeróbio melhora aptidão funcional de ratos idosos. *Ver Bras Med Esporte.* 2008;14(6):533-38.

De Araujo GG, Papoti M, Gobatto FB, Mello MA, Gobatto CA. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos *Wistar*. *Ver Bras Esporte.* 2010;16(1):51-56.

De Araujo GG, Papoti M, Manchado F de B, de Mello MA, Gobatto CA. Protocols for hyperlactademia induction in the lactate minimum teste adapted to swimming rats. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2007;148(4):882-92.

Delshad M, Ghanbarian A, Mehrabi Y, Sarvghadi F, Ebrahim K. Effect of strength and short-term detraining on muscle mass in women aged over 50 years old. *Int J Prev Med*. 2013 Dec;4(12):1386-94.

Department of Health: Start Active, Stay Active: A Report on Physical Activity for Health from the Four Home countries' Chief Medical Officers. London: Department of Health; 2011.

Dos-Santos JW, de Mello MAR. Endurance Swimming Periodized Training in rats . *J Exerc Physiol Pnline*. 2010;5(13):29-43.

Dos Santos CM, Hilgert JB, Padilha DM, Hugo FN. Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. *Gerodontology*. 2010;27:134-40.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of candida species infections in critically ill non-Immunossuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003; 3(11); 685-702.

Enos RT, Velázquez KT, McClellan JL, Cranford TL, Walla MD, Murphy EA. Reducing the dietary Omega-6: Omega-3 utilizing α -linolenic acid; not a sufficient therapy for attenuating high-fat-diet-induced development nor related detrimental metabolic and adipose tissue inflammatory outcomes. *PLoS One*. 2014 Apr 14;9(4).

Eyre HA¹, Papps E, Baune BT. Treating depression and depression-like behavior with physical exercise: an immune perspective. *Front Psychiatry*. 2013;4;4:3.

Ewers I, Rizzo LV, Kalil Filho J. *Imunologia e envelhecimento*. Einstein.2008; 6(1):13-20.

Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*.2000;18:553-62.

Ferreira CKO, Prestes J, Donatto FF, Vieira WHB, Palanch AC, Cavaglieri CR. Efeitos agudos do exercício de curta duração sobre a capacidade fagocitária de macrófagos peritoniais em ratos sedentários. *Ver. Bras. Fisiotr*. 2007; 3(11): 191-197.

Ferreira CKO, Prestes J, Donatto FF, Verlengia R, Navalta JW, Cavaglieri CR. Phagocytic response of peritoneal macrophages and neutrophils are different in rats following prolonged exercise. *Clinics*. 2010;65(11):1167-1173.

Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, Benedictis G. Na Evolutionary perspective on immunnosenescence. Ann NY Acad Sci. 2000;908:244-54.

Gasparoto TH, Dionísio TJ, De Oliveira CR, Proto VC, Gelani V, Santos CF. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. J. Med. Microbiol. 2009a; 58:959-62.

Gasparoto TH, Vieira NA, Porto VC, Campanelli AP, Cunha FQ, De Oliveira CE, Garlet GP, Lara VS. Activation patterno f neutrophils from blood of elderly individuals with *Candida*-related denture stomatitis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012;31:1271-1277.

Gasparoto TH, Vieira NA, Porto VC, Campanelli AP, Lara VS. Ageing exacerbates demange of systemic and salivary neutrophils from patients preeting *Candida* related denture stomatitis. Immun. Ageing. 2009b;6:3.

Gomes da Silva S, Simões PS, Mortara RA, Scorza FA, Cavalleiro EA, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Arida RM. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. J Neuroinflammation 2013;10;10-61.

Gomes GB e Gama EF. Análise do músculo esquelético de ratos *Wistar* idosos submetidos a um treinamento resistido. Rev Eletr. 2007;1:71-72.

Goto M. Inflammaging (inflammation + aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory? Biosci Trends. 2008 Dec;2(6):218-30

Gholamnezhad Z¹, Boskabady MH¹, Hosseini M², Sankian M³, Khajavi Rad A. Evaluation of imune response after moderate and overtraining exercise in wistar rat. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(1):1-8.

Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. J Neuroinflammation. 2008 Nov 11;5:51.

Harris D, Haboubi N. Malnutrition screening in the elderly population. J R Soc Med. 2005;98:411-414.

Huang CJ, Zourdos MC, Jo E, Ormsbee MJ. Influence of physical activity and nutrition on obesity-related immune function. ScientificWorldJournal. 2013:752071.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico 2010 [texto interte]. Rio de Janeiro: IBGE 2011 [acesso em 2011 nov 25]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2010/indicadoressociaaismunicipais.pdf>

Jiang X, Tian W, Yon KS, Jin Q, Mark RN. Macrophages in solid organ transplantation. *Vasc Cell*. 2014;11;6(1):5.

Jia LL, Kang YM, Wang FX, Li HB, Zhang Y, Yu XJ, Qi J, Suo YP, Tian ZJ, Zhu Z, Zhu GQ, Qin DN. Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. *PLoS One*. 2014 Jan 17;9(1).

Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications. The role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 2014 Apr 11;15(4):6184-223.

Kadoglou NPE, Kostomitsopoulos N, Kapelouzou A, Moustardas P, Katsimpoulas M, Giagini A, Dede E, Boudoulas H, Konstantinides S, Karayannacos PE, Liapis CD. Effects of exercise training on the severity and composition of atherosclerotic plaque in apoE-deficient mice. *J Vasc Res* 2011;48:347-356.

King LA¹, Salarian A, Mancini M, Priest KC, Nutt J, Serdar A, Wilhelm J, Schlimgen J, Smith M, Horak FB. Explore outcome measures for exercises intervention in people with Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2013:572134.

Kumar DS, Song-bai Z, Shi-jin X, Kalionis M. Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly to infections. *Chin Med J* 2012;125(18):3325-3331.

Krujisen-Jaarsma M, Révész D, Bierings MB, Bulffart LM, Takken T. Effects of exercise on immune function in patients with cancer: a systematic review. *Exerc Immunol Rev*. 2013; 19:120-43.

Leandro CG, De Castro RM, Nascimento E, Pithon-Curi TC, Curi R. Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. *Ver. Bras. Med. Esporte* 2007; 5(13): 343-348.

Lesniewski LA, Durrant JR, Connel ML, Henson GD, Black AD, Donato AJ, Seals DR. Aerobic exercise reverses arterial inflammation with aging in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301(3):H1025-32.

Lyon JP, Costa SC, Totti VMG, Munhoz MFV, Rezende MA. Predisposing conditions for *Candida ssp.* carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can. J. Microbiol.* 2006; 52:562-7.

Machado FB, Gobatto CA, Contarteze RVL, Papoti M, Mello MAR. Máxima fase estável de lactato é ergômetro-dependente em modelo experimental utilizando ratos. *Rev Bras Med Esporte.* 2006; 12(5): 259-262.

Marques LP, Flores JT, Barros Junior Ode O, Rodrigues GB, Mourão Cde M, Moreira RM. Epidemiological and clinical aspects of urinary tract infection in community-dwelling elderly women. *Braz J Infect Dis.* 2012;16(5):436-41.

Magliano E, Grazioli V, Deflorio L, Leuci AI, Mattina R, Romano P, Coccuza CE. Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:1-6.

Meneguello-Coutinho M, Caperuto E, Bacurau AV, Chamusca G, Uchida MC, Tibana RA, Pereira GB, Navalta JW, Wasinski F, Cavaglieri CR, Prestes J, Costa Rosa LF, Bacurau RF. Effects of dietary restriction or swimming on lymphocytes and macrophages functionality from old rats. *Immunol Invest.* 2014;43(2):113-22.

Montoya-Ortiz G. Immunosenescence, aging, and systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013;2013:267078.

Mota SMQ, Porto DB, Freitas MVC, Nogueira JAQ. Imunossenescência: imunológicos changes in the elderly. *Rev, Bras. Med.* 2009; 6(67): 183-188.

Moskona D, Kaplan I, Oral Lesions in elderly dentura wearers. *Clin. Prev. Dent.* 1992;14:11-4.

Nicklas BJ, Brinkley TE. Exercise training as a treatment for chronic inflammation in the elderly. *Exerc Sport Sci Rev.* 2009;37(04):165-170.

Nunes RB¹, Tonetto M, Machado N, Chazan M, Heck TG, Veiga AB, Dall'Ago P. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl Physiol.* 2008;108(6):1641-7.

Ogihara CA, Schoorlemmer GH, Lazari Mde F, Giannocco G, Lopes OU, Colombari E, Sato MA. Swimming exercise changes hemodynamic responses evoked by blockade of excitatory amino receptors in the rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats. *Biomed Res Int.* 2014: 487129.

Oliveira CA, Rogatto PG, Luciano E. Efeitos do treinamento de alta intensidade leucócitos de ratos diabéticos. Rev Bras Med Esporte. 2002;8(6):219-224.

Ortega e Froner MA, Barriga C. Exercise – Induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. J. Physiol. 1997;498: 729-734.

Palmer DB. The effect of age on thymic function. 2013;7;4:316.

Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. Exerc Immunol Rev. 2005.

Pedersen BK, Bruunsgaard H, Ostrowski K, Krabbe K, Hansen H, Krzykowski K, Toft A, Sodergaard SR, Petersen EW, Ibfelt T, Schjeling P. Cytokines in aging and exercise. 2000;21(1): 4-9.

Pereira JG, TCBC- SP1, Farrath S, Soldá SC, TCBC- SP1, Perlingeiro JAG, TCBC- SP1, Assef JC, TCBC-SP2. Análise comparativa das características do trauma entre idosos com idade superior e inferior a 80 anos. Rev. Col. Bras. Cir. 2013; 40(4): 269-274. <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/população/censo2010/sinopse.pdf>.

Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. Community Dent Oral Epidemiol. 2005;33:81-92 .

Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. J. Oral. Rehabil. 2002;29: 1115-9.

Pirofski L, Casadevall A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. J Exp Med. 2009;206:269-73.

Qian F¹, Guo X, Wang X, Yuan X, Chen S, Malawista SE, Bockenstedt LK, Allore HG, Montgomery RR. Reduced bioenergetics and toll-like receptor 1 function in human polymorphonuclear leukocytes in aging. Aging. 2014;6(2):131-139.

Rocha NP, Reis JH, Teixeira AL. Inflammaging: a new paradigm for gerontological sciences. Geriatrics & Gerontology. 2010;4(4):224-228

Rogatto GP, Luciano E. Perfil leucocitário de ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*) submetidos ao exercício resistido crônico. Biosci J. 2002; 18(1): 51-63.

Roque FR, Soci UP, De Angelis K, Coelho MA, Furstenau CR, Vassallo DV, Irigoyen MC, Oliveira EM. Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. *Clinics*.2011.

Ryan AS, Harduarsingh-Permaul AS. Effects of weight loss and exercise on trunk muscle composition in older women. *Clin Interv Aging*. 2014 3;9:395-402.

Schiattarella GG, Perrino C, Magliulo F, Carbone A, Bruno AG, De Paulis M, Sorropago A, Corrado RV, Bottino R, Menafrà G, Abete R, Toscano E, Giugliano G, Trimarco B, Esposito G. Physical activity in the prevention of peripheral artery disease in the elderly. *Front Physiol*. 2014 3;5:12.

Solomon E¹, Rees T, Ukoumunne OC, Metcalf B, Hillsdon M. Personal, social, and environmental correlates of physical activity in adults living in rural south-west England: a cross-sectional analysis. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2013;21;10:129.

Syu G, Chen H, Jen CJ. Severe exercise and exercise training exert opposite effects on human neutrophil apoptosis via altering the redox status. *Plos one*. 2011;6(9).

Shaw AC, Goldstein DR, Montgomery RR. Age-dependent desregulation of innate immunity. *AOP* , published online 2013; doi:10.1038/nri3547.

Tanida T, Ueta E, Tobiume A, Hamada T, Rao F, Osaki T. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J Oral Pathol Med*.2001;30:328-35.

Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):184-90.

Thawornchaisit P¹, de Looze F, Reid CM, Seubsman SA, Sleigh AC; Thai Cohort Study Team. Health risk factors and the incidence of hypertension: 4-years prospective findings from a national cohort of 60 569 Thai Open University students. *BMJ Open*. 2013; 25;3(6).

Vaisberg MW, Rosa LFPBC. Influências do exercício na resposta imune. *Rev. Bras. Med. Esporte*.2002; 4(8): 167-172.

Voltarelli FA, Mello MAR Gobatto CA. Anaerobic threshold determined by lactate minimum test in rats: Effect of muscle glycogen stores and of physical training. *Rev Port Cien Desp*. 2004;4:3:16-25.

Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MAR. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002;35:1-6.

Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simom P. Position Statement Part One: Immune function and exercise. *Exerc. Immunol. Rev.* 2011; 17:6-63.

Yang YL, Virulence factors of *candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2003; 36:223-8.

Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ.* 2006;174(6):801-9.

Woods JA, Lu Q, Coddia MA, Lowder T. Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol.* 2000;78:545-553.

Zhang K, Ma X, He W, Li H, Han S, Jiang Y, Wu H, Han L, Ohno T, Uotsu N, Yamaguchi K, Ma Z, Tu P. Extract of *Cistanche deserticola* can antagonize immunosenescence and extend life span in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAM-P8) mice. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014:601383.

APÊNDICE

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 018/2012

Bauru, 9 de agosto de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito do exercício físico na Capacidade Fagocítica dos Macrófagos: comparação entre ratos jovens e idosos**, de autoria de Felipe Alavarce de Oliveira, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** "ad referendum" desta Comissão nesta data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Vanessa Soares Lara
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO

ANEXO A - Tabelas de dados e resultados obtidos.

Tabela 1 - Peso corporal, obtido semanalmente, por oito semanas consecutivas de exercício físico aeróbico moderado, imposto sobre ratos idosos (N = 13).

Ratos Idosos Treinados														
Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Média
1	362	291	312	347	320	272	358	377	485	612	497	410	478	393,9±94,41
2	360	290	308	347	315	265	358	380	482	613	497	408	480	392,5±99,92
3	361	288	308	347	312	266	358	382	485	614	497	406	482	392,8±100,67
4	365	290	310	348	316	266	358	381	487	617	498	406	484	394,3±100,9
5	364	289	307	349	317	267	361	380	485	615	500	406	483	394,1±100,53
6	365	288	308	350	317	267	363	382	486	616	502	409	484	395,2±100,95
7	365	289	310	350	319	268	360	380	485	615	499	410	482	394,8±99,93
8	365	290	310	350	320	270	360	380	485	615	500	410	480	395,0±99,51

Tabela 2 - Peso corporal médio, obtido na primeira e última semana no grupo IS.

Ratos Idosos Sedentários	
Semanas	Média
1	393,9±94,41
8	458,10±131,00

Tabela 3 - Peso corporal, obtido semanalmente, por oito semanas consecutivas de exercício físico aeróbico moderado, imposto sobre ratos jovens (N = 13).

Ratos Jovens Treinados														
Semanas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Média
1	235	190	195	190	210	256	249	249	288	266	260	252	246	237,4±31,41
2	250	205	213	210	220	256	260	315	297	260	267	266	254	251,8±33,02
3	255	210	215	210	225	260	270	320	310	260	275	280	260	257,7±35,39
4	279	234	242	246	260	285	298	350	330	285	308	290	280	283,6±33,67
5	290	247	265	266	277	305	320	364	358	302	332	315	302	303,3±35,14
6	300	267	271	282	285	312	332	378	356	310	339	326	295	311,8±33,40
7	307	279	280	284	292	328	342	382	370	336	349	346	318	324,1±34,13
8	311	280	290	296	309	333	350	394	378	339	355	350	318	331,0±34,28

Tabela 4— Média e desvio padrão do percentual de macrófagos peritoneais com microrganismos internalizados, *C. albicans* (SC5314) ou *E. coli* (O:124), após 30 e 120 minutos de desafio in vitro. As células foram obtidas de animais idosos e jovens, treinados ou sedentários. N = 12 para IT, N = 12 para IS, N = 13 para JT e N = 12 para JS. Teste estatístico Anova one-way e Teste de Tukey HSD a quatro critérios (IT vs IS; IT vs JT; IS vs JS; JT vs JS). *,# $p < 0,05$, quando comparado com os jovens, no mesmo período de desafio.

% de Internalização dos microrganismos					
Grupo		<i>C. albicans</i>		<i>E.coli</i>	
		30'	120'	30'	120'
Sedentários	Idosos	25,77±9,95*	25,77±7,33*	26,83±5,81*	30,52±9,52*
	Jovens	16,79±9,73	21,57±10,12	13,71±10,11	15,28±7,41
Treinados	Idosos	38,92±13,15 [#]	38,96±11,64 [#]	37,21±4,45 [#]	35,47±6,48 [#]
	Jovens	20,41±14,44	29,65±8,27	28,05±11,18	28,95±11,83