UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS APÓS A
PERDA DE PESO EM RATOS ENVELHECIDOS:
EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA OU DO EXERCÍCIO AERÓBIO

Marcela Oliveira Meneguello

SÃO PAULO
2000

ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS APÓS A
PERDA DE PESO EM RATOS ENVELHECIDOS:
EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA OU DO EXERCÍCIO AERÓBIO

MARCELA OLIVEIRA MENEGUELLO

Dissertação apresentada à Escola
de Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Educação
Física.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUÍS FERNANDO B. P. COSTA ROSA

AGRADECIMENTOS

Dedico esta Tese:

A minha família: Rubens, Clara, Fernando e a “caçula” Cynara;

Ao meu amor, Alberto;

Ao GG pela amizade, paciência, dedicação e confiança imprescindível na minha formação acadêmica, desde os tempos de iniciação científica... E também, por me levar a estudar este maravilhoso assunto que é o envelhecimento!

Agradeço:

Ao “Grande Arquiteto do Universo” e a todos os “amigos” que sempre me acompanham e auxiliam...

Aos meus grandes amigos Mônica Aparecida Belmonte e Érico Chagas Caperuto companheiros de “viagem”, que estão sempre por perto, principalmente nas horas mais conturbadas.

Ao Reury Frank Pereira Bacurau pela amizade, pelas conversas que tanto enriquecem nosso cotidiano e pelo auxílio nas horas de “histeria”.

Ao Francisco Navarro pelos “empurrões” na vida prática, e exemplo de força de vontade e persistência.

À Gabriela Chamusca (Bia) e Eivor Martins Júnior pela amizade, carinho, respeito e discussões “críticas” sobre os nossos trabalhos.

À Patrícia Soares Rogeri pela oportunidade de aprendizado, entusiasmo, amizade e o “braço” do dia a dia.

Aos companheiros de Laboratório que sempre têm um motivo para inúmeras conversas e “gargalhadas”: André Albernaz Pellegrini, Anelisa Ferreira de Almeida Magalhães, Marco Carlos Uchida, Miguel L. Batista,

Mauro Vainsberg, Reinaldo Abunasser Bassit (Tubarão), Ronaldo Vagner Thomatielli dos Santos.

Ao pessoal mais novo do Laboratório: Aline Villa Nova, Andréa Somolanji Vanzelli, Hélio Antônio Correa de Souza, Graziela Rosa Ravacci, Sara Borges Tomarchio, Wagner da Silva Vicente, Théo Tri Huynh Trung que dão uma injeção de ânimo através da força de vontade e curiosidade sobre a “vida no laboratório”.

À Profa. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender pela amizade, carinho, disponibilidade e apoio “lipídico” (seja para entender o metabolismo ou para ajudar na sua “eliminação” durante as corridas esporádicas!).

À Profa. Dra. Alisson Colquhoun pela paciência e ajuda nas horas de “emergência”!

À Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos pela ajuda nos primeiros passos deste caminho e também pelo seu imenso carinho e amizade.

Ao pessoal do laboratório de histofisiologia pelas brincadeiras e “bichices” essenciais: Ana Cristina Fossati, Adriana Carvalho dos Santos, André Luís A.R. Almeida, Flávia Regina Carreño, Karina Lawrence Ramos, Marcelo Saldanha Aoki, Melissa Kazantzis, Priscila Silvana Bertevello, Priscila Santos Donghia.

Ao Cláudio, nosso “faz tudo” e ao pessoal do biotério Iracema Soares do Nascimento (Santa) e Nancy de Queiroz Silva, por cuidarem com carinho dos meus “velhinhos”!

À Profa. Cláudia Monteiro Peixoto, Elaine Massami Nojima e principalmente a Profa. Dra. Julia Maria Pavan Soller, do Depto de Estatística do IME-USP, pelo imprescindível auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. José Alberto Aguillar Cortez pelo constante incentivo, confiança e apoio indispensável para a execução desta tese.

Aos amigos da Fitcor, Carlos Eduardo de Souza Franco, Edson Pereira da Silva, Márcio Oliveira de Souza, Patrícia Helena Gomes Pereira, Patrícia Helena Poggio Cortez, Jéssica Roberta Canoletti, Amanda Inácia de Souza e Elisandra Rafaella Gasparetto.

À Maria de Lourdes Silva e Célia Yamaoka da secretaria de Pós-graduação da EEFUESP pelo constante atendimento atencioso.

Ao pessoal do xerox do ICB pelo paciente e solícito atendimento.

Ao pessoal da biblioteca do ICB pela eficiência e alegria, sempre!

A todos da biblioteca da EEFUESP, Sérgio Cyriaco, Lúcia Franco, Selma Tripiciano, Rejiane Pereira dos Santos, Elza Carvalho e Amélia Aoki, que atenciosamente acompanharam minha vida acadêmica, desde os tempos de faculdade!

À Luciana Junqueira Spoto pela ajuda na revisão final.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto 98/03199-0).

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	x
	LISTA DE FIGURAS	xv
	LISTA DE QUADROS.....	xix
	LISTA DE ABREVIACÕES.....	xx
	LISTA DE ANEXOS	xxiii
	LISTA DE APÊNDICES	xxvi
	RESUMO.....	xxvii
	ABSTRACT	xxix
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO	4
3.1	O envelhecimento.....	4
3.2	Composição corporal & envelhecimento.....	5
3.3	Sistema imunológico & envelhecimento	7
3.3.1	Células do sistema imunológico	8
3.4	Envelhecimento & restrição calórica	13
3.5	Envelhecimento & exercício físico	16
3.5.1	Composição corporal.....	16
3.5.2	Sistema imunológico.....	21
4	METODOLOGIA.....	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Descrição dos grupos experimentais.....	26
4.2.1	Ratos adultos (AD)	26
4.2.2	Ratos envelhecidos.....	27
4.2.2.1	Envelhecidos (ENV)	27
4.2.2.2	Emagrecidos	27

4.2.2.2.1	Restrição calórica (RC)	27
4.2.2.2.2	Exercício aeróbio (EX)	28
4.3	Procedimentos experimentais	28
4.3.1	Padrão alimentar	28
4.3.2	Controle de peso	29
4.3.3	Índice de Lee	29
4.3.4	Protocolo de treinamento	29
4.3.5	Sacrifício.....	32
4.4	Determinações	32
4.4.1	Composição corporal e metabolismo lipídico	34
4.4.1.1	Quantificação do conteúdo lipídico	34
4.4.1.1.1	Sítios avaliados.....	34
4.4.1.1.2	Tratamento das amostras	34
4.4.1.1.3	Extração da fração lipídica	34
4.4.1.2	Porcentagem de gordura corporal.....	35
4.4.2	Parâmetros avaliados no músculo esquelético	35
4.4.2.1	Citrato sintase - CS (E.C. 4.1.3.7)	36
4.4.3	Parâmetros séricos	36
4.4.3.1	Tratamento do sangue	36
4.4.3.2	Glicose	37
4.4.3.3	Albumina	37
4.4.3.4	Glutamina.....	37
4.4.3.5	Insulina, cortisol, corticosterona, testosterona e GH.	38
4.4.3.6	Índice glicose / insulina	38
4.4.3.7	Interleucinas.....	38
4.4.3.8	Imunoglobulinas	39
4.5	Determinações do sistema imunológico	39

4.5.1	Peso e conteúdo protéico dos órgãos linfóides	39
4.5.2	Obtenção de células	40
4.5.2.1	Macrófagos.....	40
4.5.2.2	Linfócitos	40
4.5.3	Análises funcionais	41
4.5.3.1	Fagocitose por macrófagos.....	41
4.5.3.1.1	Obtenção e opsonização de zimozan	41
4.5.3.1.2	Avaliação da capacidade fagocitária	41
4.5.3.2	Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos	42
4.5.3.3	Proliferação de linfócitos	42
4.5.3.3.1	Células obtidas a partir do sangue total.....	43
4.5.3.3.2	Células do linfonodo mesentérico	43
4.5.3.3.3	Proliferação de células	43
4.5.4	Parâmetros metabólicos.....	44
4.5.4.1	Consumo e produção de substratos (incubação)	44
4.5.4.1.1	Determinações dos substratos.....	45
4.6	Determinações gerais	47
4.6.1	Glândulas adrenais.....	47
4.6.2	Concentração de proteína	48
4.6.3	Retirada de ácidos graxos da albumina bovina.....	48
4.7	Leituras	48
4.8	Soluções.....	49
4.9	Reagentes, enzimas e compostos radioativos.....	49
4.10	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS	51
5.1	Composição corporal.....	51
5.1.1	Progressão do peso corporal.....	51

5.1.2	Consumo de ração	51
5.1.3	Peso dos tecidos.....	54
5.1.4	Quantidade de lípides	56
5.1.5	Quantidade de proteína	61
5.1.6	Porcentagem de gordura corporal.....	61
5.2	Citrato sintase	65
5.3	Parâmetros séricos	65
5.3.1	Glicemia, Insulinemia e índice G/I	65
5.3.2	Cortisol e corticosterona	65
5.3.3	Testosterona e GH.....	65
5.3.4	Glutamina e Albumina	69
5.3.5	Interleucinas	69
5.3.6	Imunoglobulinas	69
5.4	Macrófagos.....	74
5.4.1	Capacidade fagocitária e produção de H ₂ O ₂	74
5.4.2	Consumo e produção de substratos por macrófagos.....	74
5.5	Linfócitos	78
5.5.1	Proliferação de linfócitos	78
5.5.2	Consumo e produção de substratos por linfócitos	78
6	DISCUSSÃO	83
6.1	Envelhecimento e composição corporal	83
6.2	Protocolos de emagrecimento	85
6.2.1	Avaliação dos protocolos utilizados.....	86
6.2.2	Composição corporal.....	87
6.3	Condições gerais dos grupos estudados.....	90
6.4	Alterações promovidas no sistema imunológico	92
6.4.1	Macrófagos.....	93

6.4.2	Linfócitos	96
7	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	ANEXOS.....	117
	APÊNDICES.....	127

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 -	Peso relativo dos tecidos e órgãos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n) 57
TABELA 2 -	Quantidade de lípidos presente nos tecidos adiposos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n)..... 58
TABELA 3 -	Quantidade de lípidos presente nos músculos: gastrocnêmio, solear e extensor digitório longo dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n) 59

TABELA 4 -	Quantidade de lípidos presente no fígado e carcaça dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n)	60
TABELA 5 -	Quantidade de proteína do timo e baço dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proteína em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n) ...	62
TABELA 6 -	Concentração sérica de glicose, Insulina e índice glicose/insulina dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n) da glicose em mg / dl e insulina mU / ml de soro	67
TABELA 7 -	Concentração sérica de corticosterona dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração em ng / ml de soro $\pm$ EPM (n)	68

TABELA 8 -	Concentração sérica de testosterona e GH dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração $\pm$ EPM (n), respectivamente em ng / dl e ng / ml de soro	70
TABELA 9 -	Concentração sérica de glutamina e albumina dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração $\pm$ EPM (n), respectivamente em nmol / ml e g / dl de soro	71
TABELA 10 -	Concentração sérica das Interleucina IL-1, IL-2 e IL-3 dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em pg / ml de soro $\pm$ EPM (n)	72
TABELA 11 -	Concentração sérica das Imunoglobulinas IgA e IgG dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em mg / ml de soro $\pm$ EPM (n)	73

TABELA 12 - Consumo de glicose e produção de lactato por macrófagos residentes da cavidade peritoneal incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol /1 hora x mg de proteína-1 ± EPM (n)	76
TABELA 13 - Consumo de glutamina, produção de glutamato e aspartato por macrófagos residentes da cavidade peritoneal incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol /1 hora x mg de proteína-1 ± EPM (n)	77
TABELA 14 - Consumo de glicose e produção de lactato por linfócitos do linfonodo mesentérico incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol /1 hora x mg de proteína-1 ± EPM (n)	81

TABELA 15 - Consumo de glutamina, produção de glutamato e aspartato por linfócitos do linfonodo mesentérico incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol /1 hora x mg de proteína-1 ± EPM (n)	82
--	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Relações e interações entre linfócitos.....	9
FIGURA 2 - Participação dos ácidos graxos (AGL) no fornecimento de energia.....	17
FIGURA 3 - Fontes de AGL para o músculo esquelético.....	18
FIGURA 4 - Atuação das catecolaminas na quebra de triglicérides nos adipócitos.....	19
FIGURA 5 - Modelos de susceptibilidade a infecções	22
FIGURA 6 - Fotos do sistema de natação para ratos.....	31
FIGURA 7 - Progressão do peso corporal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), durante período experimental. Os dados correspondem à média de peso semanal em gramas (g) $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO I.	52
FIGURA 8 - Consumo diário de ração dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro e seis semanas (RC-4/6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média do consumo de ração em gramas (g) $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO II	53

- FIGURA 9 - Peso relativo dos tecidos adiposos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO III..... 55
- FIGURA 10 - Porcentagem de gordura dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO IV 63
- FIGURA 11 - Correlações lineares entre a porcentagem de gordura corporal e o peso total (g) dos tecidos adiposos (TAE, TARP, TAME e TAM) e quantidade de gordura presente na carcaça (mg / g de carcaça). Os dados correspondem aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), sendo r o valor encontrado pela correlação de *Pearson*. Os dados estão apresentados no ANEXO V 64

- FIGURA 12 - Atividade máxima da enzima *citrato sintase* no músculo gastrocnêmio dos animais ENVELHECIDOS (ENV) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em nmol / minuto x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n), apresentados no ANEXO VI 66
- FIGURA 13 - Porcentagem de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média ± EPM (n), respectivamente em % e nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹, apresentados no ANEXO VII 75
- FIGURA 14 - Índice de proliferação de linfócitos presentes no sangue dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação ± EPM (n), apresentados no ANEXO VIII 79
- FIGURA 15 - Índice de proliferação de linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação ± EPM (n), apresentados no ANEXO IX 80

FIGURA 16 - Representação esquemática de dois compartimentos metabólicos nos macrófagos e linfócitos de ratos: a) energético e b) biossintético 94

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Doenças encontradas no idoso e relacionadas ao sistema imunológico	8
QUADRO 2 - Mudanças das funções imunes com a idade	13
QUADRO 3 - Influência do envelhecimento sobre a resposta aguda no exercício	23
QUADRO 4 - Influência do envelhecimento e do exercício sobre a função imunológica	25
QUADRO 5 - Representação esquemática do protocolo de treinamento.....	30
QUADRO 6 - Representação dos experimentos realizados nos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX)	33
QUADRO 7 - Origem e principais funções de algumas citocinas..	98

LISTA DE ABREVIACES

(n)	Número de amostras
AD	Animais adultos
ADP	Adenosina difosfato
AGL	cidos graxos livres
ATP	Adenosina tri-fosfato
BSA	Albumina livre de gordura
CD	Complexo de diferenciao
CFU-GM	Unidade formadora de colnias para macrófagos e granulócitos
CK	Ciclo de Krebs
CoA	Coenzima A
CPM	Contagem por minuto
CPT I	<i>Carnitina palmitoil transferase I</i>
CPT II	<i>Carnitina palmitoil transferase II</i>
CS	<i>Citrato sintase</i>
DNA	cido desoxirribonucleico
DTNB	5'-5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico)
EDL	Músculo extensor digitório longo
EDTA	cido etalenodiaminotetraactico
ENV	Animais envelhecidos
EPM	Erro padrão da mdia
EX	Animais exercitados
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FC máx	Frequência cardíaca máxima
FIG	Fígado

G-6-PDh	<i>Glicose 6-fosfato desidrogenase</i>
GASTRO	Músculo gastrocnêmio
GDh	<i>Glutamato desidrogenase</i>
GH	Hormônio do crescimento
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HK	Hexoquinase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IFN	"Interferon"
LDh	<i>Lactato desidrogenase</i>
LLP	<i>Lipase lipoprotéica</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDh	<i>Malato desidrogenase</i>
MHC	Complexo de maior histocompatibilidade
NAD ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP ⁺	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato
NADPH	β-nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato reduzida
NK	"Natural killer"
NO-	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato-salina
PG	Prostaglandinas
PMA	Éster de forbol-miristato
RC-4	Animais sob restrição calórica por quatro semanas
RC-6	Animais sob restrição calórica por seis semanas
RNA	Ácido ribonucleico
SÓLEO	Músculo solear

TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo marrom
TAME	Tecido adiposo mesentérico
TARP	Tecido adiposo retroperitoneal
TCA	Ácido tricloroacético
TGO	<i>Transaminase glutâmica oxaloacética</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidades internacionais
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio

LISTA DE ANEXOS

	Página
ANEXO I - Progressão do peso corporal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média de peso semanal em gramas (g) $\pm$ EPM (n)	117
ANEXO II - Consumo diário de ração dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro e seis semanas (RC-4/6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média do consumo de ração em gramas (g) $\pm$ EPM (n)	118
ANEXO III - Peso relativo dos tecidos adiposos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n)	119

ANEXO IV-	Porcentagem de gordura dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n)	120
ANEXO V -	Quadro equivalente aos dados utilizados para as correlações lineares apresentadas na FIGURA 11	121
ANEXO VI -	Atividade máxima da enzima <i>citrato sintase</i> no músculo gastrocnêmio dos animais ENVELHECIDOS (ENV) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / minuto x mg de proteína ⁻¹ , e correspondem à média $\pm$ EPM (n)	123
ANEXO VII -	Porcentagem de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n), da porcentagem de fagocitose e nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹ de H ₂ O ₂	124
ANEXO VIII -	Índice de proliferação de linfócitos presentes no sangue dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n)	125

ANEXO IX - Índice de proliferação de linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n) 126

LISTA DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE I - Progressão de peso dos animais ADULTOS (AD) durante o período de seis semanas. Os dados correspondem à média de peso em gramas (g) $\pm$ EPM (n)	127
APÊNDICE II - Composição da ração comercial Nuvilab CR1	128
APÊNDICE III - Índice de LEE dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n).....	129
APÊNDICE IV - Peso total dos tecidos e órgãos correspondentes dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em gramas (g) de tecido $\pm$ EPM (n) ..	130

RESUMO

ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DE MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS APÓS A PERDA DE PESO EM RATOS ENVELHECIDOS: EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA OU DO EXERCÍCIO AERÓBIO

Autora: MARCELA OLIVEIRA MENEGUELLO

Orientador: PROF. DR. LUÍS FERNANDO B. P. COSTA ROSA

O envelhecimento é marcado por inúmeras alterações fisiológicas, dentre as quais encontramos um aumento da gordura corporal e alterações na resposta do sistema imunológico. Muito se sabe sobre a intrínseca ligação entre o aumento de gordura e as doenças de risco e fica a questão à cerca de sua influência sobre as respostas do sistema imunológico, já que estes dois fatores encontram-se alterados no envelhecimento. Portanto, o propósito deste estudo foi investigar a interação entre a quantidade de gordura corporal e as células do sistema imunológico de ratos envelhecidos. Para isso, num primeiro estudo, foram utilizados ratos ADULTOS e ENVELHECIDOS para a caracterização das alterações encontradas no processo de envelhecimento. Numa segunda etapa, os animais ENVELHECIDOS foram submetidos a dois protocolos de emagrecimento, a restrição calórica a 50%(RC) e o exercício aeróbio (EX) (natação), durante o período de quatro a seis semanas. Assim, foi possível avaliar alguns parâmetros do metabolismo de macrófagos e linfócitos em ratos envelhecidos com diferentes quantidades de gordura

corporal. No primeiro estudo, os resultados comprovaram o aumento da gordura bem como algumas alterações no sistema imunológico de ratos envelhecidos, principalmente na capacidade funcional de macrófagos. Quanto ao segundo estudo, os resultados demonstram que ambos os protocolos foram eficientes em diminuir o peso corporal, bem como a gordura, sendo que para a RC os valores alcançados foram mais evidentes. Com relação ao sistema imunológico houve um aumento da resposta fagocitária e de produção de H_2O_2 por macrófagos e uma alteração da capacidade proliferativa de linfócitos, em ambos os protocolos.

Palavras chaves: Envelhecimento; Emagrecimento; Sistema imunológico; Restrição calórica; Exercício aeróbio; Macrófagos; Linfócitos.

ABSTRACT

Changes of lymphocytes and macrophages metabolism after weight loss in aging rats:

Effects of a hipocaloric diet or an aerobic exercise program

Author: MARCELA OLIVEIRA MENEGUELLO

Adviser: PROF. DR. LUÍS FERNANDO B. P. COSTA ROSA

Ageing is marked by several kinds of physiological changes, among them we find an increase of fat mass and a decline in several aspects of the immune system. It is well understood the intrinsic connexion between the increase in body fat and the risk of related diseases and the one question that remains is about the influence over the immune system response, since these two factors are altered on the ageing process. The purpose of this study was to investigate the relationship among fat content and immune cells of the aging rats. For this, in one first study, we used ADULTS and AGEING rats to determine the changes found in the ageing process. In the second time, the AGEING rats were submitted to two protocols for weight loss (slimming), 50% of caloric restriction (CR) and aerobic exercise (swimming) (EX), for four or six weeks. In this way, we can study some parameters of macrophages and lymphocytes metabolism in ageing rats with different body fat content. In the first study, the results confirmed the fat increase as well as some changes in the immune system of the ageing rats, especially in the macrophages

functional capabilities. In the second study, the results showed that both protocols decreased body fat and weight, with the best results happening with CR protocol. The immune system had an increase on the phagocytic response and H_2O_2 production for macrophages and alterations of the proliferative capacities of the lymphocytes, in both protocols.

Key words: Aging; Weight loss; Immune system; Caloric restriction; Aerobic exercise; Macrophage; Lymphocyte.

1 INTRODUÇÃO

Uma das maiores mudanças observadas no século XX foi o aumento da longevidade do ser humano, sendo que hoje a expectativa de vida equivale a quase o dobro da idade alcançada no início do século. Além disso, os avanços na área de saúde propiciaram o aumento da representatividade dos idosos na pirâmide etária e, segundo a OMS (2000) com o passar dos anos, haverá mudança na distribuição demográfica mundial caracterizada principalmente pelo aumento da porcentagem da população idosa. Acredita-se que no ano 2010 a população idosa será o dobro dos dias atuais (LU, CEDDIA, PRICE, YE & WOODS, 1999), e as progressões indicam que em 2050, 16% da população brasileira será constituída por indivíduos com idade acima de 60 anos (ONU, 2000)

Com isso, é imprescindível uma adaptação da sociedade a essa nova realidade, possibilitando uma melhor qualidade de vida para os idosos, atendendo principalmente suas necessidades na área de saúde, uma vez que os maiores gastos com a saúde ocorrem nos últimos anos de vida (WICK, JANSEN-DURR, BERGER, BLASKO & GRUBECK-LOEBSTEIN, 2000).

Todos os processos vinculados ao envelhecimento encontram-se relacionados à diminuição dos mecanismos envolvidos na manutenção da homeostase, implicando num decréscimo da viabilidade ou aumento da vulnerabilidade ao estresse (tanto o estresse como fator interno ou externo ao organismo) (TIMIRAS, 1994).

Dentre as alterações encontradas com o avanço da idade observamos a queda na eficiência de algumas funções fisiológicas, como ocorre com o sistema imunológico. Hoje, sabe-se que este sistema, além de sua clássica função na defesa contra agentes externos, contribui para a manutenção do equilíbrio interno do organismo (KENNEY, 1989; MACKINNON, 1999), fazendo com que algumas mudanças em suas funções desestabilizem outros sistemas corporais.

Esta deterioração do sistema imunológico que ocorre com o envelhecimento, conhecida como imunosenescência, segundo PAWELEC, EFFROS, CARUSO, REMARQUE, BARNET, & SOLANA (1999), está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade em seres humanos, além de ser responsável pela maior incidência de infecções, doenças auto-imunes e câncer.

Outras funções corporais também se encontram comprometidas com o aumento da idade, como ocorre com as funções neuroendócrinas, hepáticas, gastrintestinais, renais entre outras (TIMIRAS, 1994). Como consequência ou causa deste quadro, existe também uma profunda modificação na composição corporal, caracterizada pelo aumento da gordura e diminuição da massa livre de gordura (composta pelo tecido muscular, tecido ósseo e água) (EVANS, 1992).

As interações entre os vários sistemas corporais resultam no melhor rendimento das funções fisiológicas. Atualmente o sistema imunológico é considerado um sistema que tem grande capacidade de interação, influenciando e sendo influenciado por outros sistemas e condições corporais. Nos últimos anos houve um grande avanço no estudo do quadro de imunossupressão que acompanha o envelhecimento (ALMEIDA, 1994; PAHLAVANI, HARRIS & RICHARDSON, 1995; SPENCE, 1995), mas até o momento não se sabe quais as causas responsáveis por estas mudanças.

Como o aumento da gordura corporal está relacionada a hábitos alimentares e estilo de vida e leva a instalação de diversas patologias, fica a questão à cerca do seu papel sobre a função do sistema imunológico no envelhecimento, já que alterações na composição da gordura da dieta pode exercer alguma influência na resposta imunológica (CALDER, COSTA ROSA & CURI, 1995; COSTA ROSA, ALMEIDA, SAFI & CURI, 1993).

2 OBJETIVOS

Sabendo-se que no envelhecimento existe um aumento da gordura corporal e diminuição da resposta imunológica, o propósito deste estudo foi investigar as possíveis interações destas alterações em ratos envelhecidos.

Para tanto, em animais ADULTOS e ENVELHECIDOS foi avaliada a composição corporal, a capacidade funcional e metabólica de macrófagos e linfócitos. Além disso, nos animais ENVELHECIDOS, estudou-se duas estratégias de emagrecimento: a restrição calórica e o exercício aeróbio.

De forma a facilitar a compreensão dos objetivos alcançados, este estudo foi dividido em duas etapas:

a) Envelhecimento: Na qual foram utilizados ratos ADULTOS e ENVELHECIDOS para a caracterização das alterações provocadas pelo processo de envelhecimento, sendo o rato envelhecido um modelo de estudo do sistema imunológico na presença de grande quantidade de gordura corporal.

b) Emagrecimento: Na qual, ratos envelhecidos foram submetidos a dois protocolos de emagrecimento, a restrição calórica (RC) ou exercício aeróbio (EX). Possibilitando o estudo do sistema imunológico na presença de reduzida quantidade de gordura corporal.

Assim a comparação entre os grupos avaliados permitiu verificar os seguintes aspectos sobre as células do sistema imunológico:

- a) O efeito do envelhecimento;
- b) Os efeitos de grande quantidade de gordura corporal;
- c) Os efeitos da diminuição da gordura corporal;
- d) O efeito da RC e
- e) O efeito do EX.

3 REVISÃO

3.1 *O envelhecimento*

O envelhecimento pode ser visto como uma inadequação dos mecanismos homeostáticos que progressivamente diminuem a adaptação do organismo às alterações do meio, culminando na falência do sistema e conseqüentemente na sua morte (IMAHORI, 1992; KENNEY, 1989).

O motivo e a forma pela qual estas alterações ocorrem ainda não é conhecido, mas algumas teorias tentam elucidar o processo de envelhecimento, como é o caso da teoria dos eventos estritamente programados (CRISTÓFALO, PHILLIPS, SORGER & GERHARD, 1985), segundo a qual o envelhecimento e morte seriam estágios programados geneticamente numa seqüência que se inicia com a fertilização; e a dos acúmulos de erros ao acaso (ORGEL, 1970; SZILARD, 1959) que justifica o envelhecimento como o resultado do acúmulo de erros durante a síntese de macromoléculas ou do material genético que, quando ampliados, levam à morte do organismo. Apesar das duas teorias serem distintas, elas não são totalmente excludentes, podendo-se postular a complementação de uma teoria pela outra.

Várias outras linhas de pesquisa também se propõem a explicar o envelhecimento baseando-se: nas falhas do controle genético e do sistema imunológico, mutações somáticas, formação exacerbada de radicais livres, ligações cruzadas ("*cross-linkage*") e em causas metabólicas (DICE, 1993; GOLDSTEIN, 1989).

A teoria baseada no acúmulo de erros recebeu grande estímulo a partir da "Teoria da Catástrofe" postulada por ORGEL (1970). O mesmo propôs que erros na síntese de proteínas poderiam ser amplificados, levando a um aumento na síntese de proteínas alteradas e, conseqüentemente, à inviabilidade celular. Sabe-se que a alteração de componentes intracelulares importantes leva a uma modificação da funcionalidade celular. Apesar da ocorrência desses erros já estar conhecida no tocante ao processamento da

informação genética (DNA, RNA, proteínas), nenhum trabalho conseguiu evidências de que estes erros seriam os únicos responsáveis pelo envelhecimento (ROTHSTEIN, 1990). É certo, no entanto, que uma gama de anormalidades cromossômicas é encontrada em células de indivíduos senescentes (HARLEY, FUTCHER & GREINER, 1990; VAZIRI, SCHÄCHTER, UCHIDA, EWI, EFFROS, COHEN & HARLEY, 1993).

A formação de radicais livres, substâncias altamente instáveis e de alto potencial de oxidação, também pode apresentar-se aumentada pela ação enzimática anormal da célula, ou pela influência de fatores externos como doenças, cigarro, drogas e radiação (HARMAN, 1988). Da mesma forma, os mecanismos enzimáticos de neutralização destes radicais (como as enzimas *Superóxido dismutase*, *Glutathione*, *Catalase*) podem se encontrar danificados. O desequilíbrio entre a produção e neutralização dos radicais livres e o conseqüente estresse oxidativo gerado pode levar à lesão de diversas moléculas como proteínas, ácidos graxos e ácidos nucléicos. De acordo com a teoria dos radicais livres com o passar dos anos, o acúmulo destas moléculas alteradas pode promover ou exacerbar o processo de envelhecimento (HARMAN, 1992).

3.2 Composição corporal & envelhecimento

Dentre as alterações provocadas pelo processo de envelhecimento encontramos uma profunda modificação da composição corporal, caracterizada principalmente pela diminuição da massa magra (sarcopenia) e aumento da massa de gordura.

Sobre a gordura corporal, MASORO (1992) mostra que há aumento da massa total do tecido adiposo após os sessenta anos, e muito se sabe sobre a sua intrínseca ligação com a incidência de doenças, como: hipertensão, doença renal, doenças pulmonares, dislipidemias, alterações cardiovasculares, diabetes, entre outras (ACSM, 1994; McARDLE, KATCH &

KATCH, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993), e na sociedade moderna o maior número de mortes é decorrente de doenças como o câncer e doenças cardiovasculares (POLLOCK & WILMORE, 1993).

No organismo, os estoques de gordura se encontram sob diversas formas, estando localizados em determinadas partes do corpo, como a gordura visceral e distribuídos de forma uniforme sob o tecido subcutâneo. A distribuição de gordura entre os diferentes depósitos é determinada principalmente pelos hormônios sexuais, sendo que em mulheres a tendência de acúmulo de gordura se encontra na região dos quadris e coxas (ginóide, ou "lower-body") e nos homens, ocorre principalmente na região do tronco e membros superiores (andróide ou "upper-body") (McARDLE et alli, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993).

Até pouco tempo atrás se acreditava que, em seres humanos e roedores, as alterações na quantidade de gordura corporal se dava pelo aumento do tamanho e não no número de células (BAILEY, BARKER & BEUCHENE, 1993; McARDLE et alli, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993). Estes fatos foram baseados nos estudos que mostravam períodos específicos para aumento do número de células adiposas (hiperplasia), ocorrendo principalmente no feto em gestação (3º Trimetre) e posteriormente na puberdade (McARDLE et alli, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993).

Atualmente, sabe-se que o processo hiperplásico pode ocorrer em qualquer período da vida (HAUNER, ENTENMANN, WABITSCH, GAILLARD, AILHAUD, NÉGREL & PFEIFFER, 1989), já que a formação dos adipócitos ocorre a partir de pré adipócitos (AILHAUD & HAUNER, 1997) e estes podem ficar latentes até haver estímulos adequados para sua diferenciação.

Este fato é reforçado pelos estudos realizados em animais geneticamente obesos (como camundongos ob/ob), nos quais algumas manipulações, como dieta com alimentos palatáveis ou exposição ao frio, levam ao aumento hiperplásico do tecido adiposo (BAILEY et alli, 1993). Em seres humanos, estudos mostram que o número de adipócitos pode

aumentar cerca de três vezes no caso de obesidade mórbida (HIRSCH & BATCHELOR, 1976).

O aumento da quantidade de gordura durante o processo de envelhecimento pode estar relacionado a diversos fatores, dentre eles encontra-se: o comportamento alimentar (ingestão calórica e composição da dieta), diminuição das atividades físicas diárias e as mudanças do estilo de vida. Talvez as alterações encontradas não estejam diretamente relacionadas ao processo de envelhecimento *per se*, mas sim, ao comportamento adquirido ou acentuado pelo aumento da idade (SHEPHARD, 1998).

3.3 *Sistema imunológico & envelhecimento*

O sistema imunológico também sofre alterações durante o processo de envelhecimento. Hoje, sabe-se que este sistema, além de sua clássica função na defesa contra agentes externos, contribui para a manutenção da homeostase (KENNEY, 1989), o que faz com que alterações no sistema imunológico desestabilizem outros compartimentos do organismo. IMAHORI (1992) propõe a existência de "órgãos supervisores", formados pelo sistema nervoso central e imunológico, cuja disfunção determinaria a regressão de outros órgãos levando a degeneração encontrada com o passar dos anos.

Esta deterioração do sistema imunológico com o avanço da idade (imunosenescência), segundo PAWELEC et alli (1999) está relacionada à morbidade e mortalidade em seres humanos, além de aumentar a incidência de infecções, doenças auto-imunes e câncer, como na ilustrado no QUADRO 1, adaptado de WICK et alli (2000).

QUADRO 1 - Doenças encontradas no idoso e relacionadas ao sistema imunológico.

Alterações do Sistema Imunológico	Consequências
↓ geral da reatividade imunológica celular e humoral	➤ Infecções ➤ Câncer
↓ do potencial para discriminar entre o "próprio" e "não próprio"	➤ Autoimunidade
↓ especificidade	➤ Infecções ➤ Câncer
Perda da memória	➤ Infecções ➤ Vacinações sem sucesso

Algumas teorias procuram explicar o envelhecimento através das falhas do sistema imunológico, pela hipótese auto-imune. Estas defendem que o declínio observado durante o avançar da idade é secundário ao aumento de reações auto-ímmes, havendo desta forma uma "auto-rejeição" (WALFORD, 1974). WICK et alli (2000) ressaltam que as deficiências imunológicas encontradas no idoso podem ser primárias e secundárias, podendo, esta última, estar associada à má nutrição, mudanças metabólicas, uso de medicações, entre outras.

3.3.1 Células do sistema imunológico

As células envolvidas na resposta imunológica atuam em diversas etapas na resposta provocada por agentes externos ou malignidades. Os linfócitos e macrófagos, células constituintes do sistema imunológico, garantem ao organismo a capacidade de defesa contra infecções, proliferação de células tumorais e controle de processos alérgicos.

Os linfócitos são células originadas nos órgãos linfóides primários, timo e medula óssea, que migram para órgãos linfóides secundários, como o baço, os linfonodos e placas de *Peyer*. O órgão de maturação do linfócito determina sua característica quanto à participação na resposta imune. Os linfócitos T possuem diferenciação e maturação intratímica e estão relacionados com a resposta imunitária celular. Já os linfócitos B atingem a maturidade na medula óssea e estão relacionados com a imunidade humoral (SPENCE, 1995). Na FIGURA 1 podemos observar as relações existente entre os linfócitos.

B = Linfócito B, T = Linfócito T, Th= Linfócito T "helper", Tc=Linfócito T citotóxico.

FIGURA 1- Relações e interações entre linfócitos.

Os macrófagos, células de formato irregular medindo 25 a 50 μm de diâmetro (GARTNER & HIATT, 1993), são responsáveis pela primeira linha de defesa, fazendo parte do sistema mononuclear fagocitário, que tem como responsabilidade remover material ou células estranhas ao organismo, atuando também nos processos de reparação de dano tecidual (ROITT, BROSTOFF & MALE, 1996). Os macrófagos são produzidos pela medula óssea a partir da célula progenitora denominada unidade formadora de colônia, granulócitos e macrófagos ('colony-forming unit, granulocyte-macrophage - CFU-GM') (GARTNER & HIATT, 1993), que dá origem aos monoblastos que por sua vez, prolifera-se e diferencia-se em pró-monócitos, gerando os monócitos (AUGER & ROSS, 1992).

Uma vez formados, os monócitos permanecem na medula por cerca de 24 horas antes de entrar na circulação periférica (FURTH & VAN AND SLUITER, 1986; MEURET & HOFFMANN, 1973) aonde permanecem, em média, por 25 horas (AUGER & ROSS, 1992). Em humanos os monócitos representam cerca de 1 a 6% do total de leucócitos circulantes correspondendo a 300-700 células por microlitro de sangue (LEWIS & MCGEE, 1992).

Após circularem pelo organismo os monócitos migram e fixam-se nos tecidos tornando-se macrófagos residentes. Em todos os tecidos encontramos os macrófagos, que são denominados segundo o lugar onde se encontram, como no fígado (célula de 'Kuppfer'), sistema nervoso central (células microgliais), ossos (osteoclastos), pulmão (macrófago alveolar), baço, medula óssea, intestino, entre outros. Outra particularidade dos macrófagos é que podem ser encontrados em estados funcionais dependentes do 'milieu' dos sinais estimulatórios e inibitórios, como na cavidade peritoneal onde os macrófagos residentes são células com baixa atividade funcional (quiescente) (LU et alli, 1999).

Com estas características, os macrófagos participam das interações bidirecionais entre a imunidade inata e a específica (ABBAS,

LICHTMAN & POBER, 2000). Na imunidade inata, dentre as principais funções exercidas pelos macrófagos, encontramos a capacidade de fagocitar partículas estranhas (micróbios e macromoléculas), e também de produzir citocinas que podem recrutar outras células inflamatórias (como os linfócitos), desencadeando um efeito em cascata. Já na imunidade específica, os macrófagos podem atuar como células apresentadoras de antígeno, funcionando como uma célula acessória na ativação de linfócitos. Além desta função, podem ser ativados pelos próprios linfócitos tornando-se células efetoras da imunidade celular e humoral, sendo o linfócito T responsável pela liberação de citocinas que estimulam a sua capacidade microbicida e antitumoricida (LU et alli, 1999) e o linfócito B responsável pela liberação de anticorpos que aumentam a capacidade de reconhecimento pelo macrófago através do processo de opsonização. Desta forma, alterações na funcionalidade de macrófagos podem modular a progressão de toda a resposta imunológica.

O macrófago, em geral, responde a dois estímulos seqüenciais, o primeiro corresponde ao estímulo inicializador e o segundo, disparador. Quando as células T ou 'Natural Killer' (NK) são ativadas acabam liberando Interferon γ (INF- γ) que inicializa a ação antitumoricida através da produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e do óxido nítrico (NO $\cdot$) pelos macrófagos, além de aumentar a sensibilidade às substâncias que funcionam como 'gatilhos disparadores'. Dentre estas substâncias encontramos o lipopolissacarídeo (LPS), que estimula a atividade bactericida, o éster de forbol-miristato (PMA), que estimula a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PICK & MIZEL, 1981).

A involução tímica, junto à diminuição de seu conteúdo protéico (ALMEIDA, 1994), observada durante o envelhecimento, parece preceder as alterações observadas na resposta imunológica (HIROKAWA, UTSUYAMA, KASAI & KURASHIMA, 1992). Estudos mostram que quando o timo obtido de animais jovens é transplantado em animais envelhecidos há reversão de

certas imunodeficiências características do envelhecimento (HIROKAWA et alli, 1992). Desta forma, o timo poderia ser considerado o centro das alterações observadas no sistema imunológico com o avanço da idade, sendo chamado de “relógio do envelhecimento” por vários autores (BURNET, 1970).

Como forma de avaliar o metabolismo tanto de linfócitos quanto de macrófagos, ALMEIDA (1994) avaliou o consumo de glutamina, importante aminoácido para o metabolismo energético das células do sistema imunológico. Seus resultados mostraram que durante o envelhecimento há uma diminuição do consumo deste aminoácido, tanto no timo como em linfócitos isolados, e que a capacidade proliferativa basal de linfócitos T e B está diminuída.

Com relação aos macrófagos, COSTA ROSA et alli (1993) mostraram um aumento no índice fagocitário e redução na produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos obtidos de ratos envelhecidos, quando estimulados por acetato de forbol-miristato (PMA).

Além destas alterações podemos encontrar, como ilustrado no QUADRO 2, outras mudanças que acompanham o processo de envelhecimento (adaptado de SHEPARD, 1997).

QUADRO 2 – Mudanças das funções imunes com o envelhecimento.

↓ da contagem de células T
↓ da proliferação espontânea
↓ da resposta a lecitinas e aloantígenos ¹
Normal ou ↓ da contagem de NK e atividade citolítica
↓ da síntese de IL-2
↓ no número e afinidade de receptores para IL-2

¹ lecitinas e aloantígenos são substâncias que induzem a proliferação celular.

3.4 *Envelhecimento & restrição calórica*

Como visto, vários estudos mostram que o envelhecimento leva a inúmeras alterações no sistema imunológico, gerando assim um quadro de imunossupressão (ALMEIDA, 1994; FIELDING & EVANS, 1997; HIROKAWA, UTSUYAMA, KASAI, KURASIMA, ISHIJIMA & ZENG, 1994; HOBBS & ERNST, 1997; MILLER, 1996; PAHLAVANI et alli, 1995; SPENCE, 1995; YU, ABEL & GLOBERSON, 1997).

Muito se tem estudado acerca das formas de melhorar este quadro de imunossupressão. Dentre elas encontram-se as manipulações dietéticas, com destaque para a restrição calórica (RC) que, quando oferecida a roedores desde o nascimento, é capaz de promover um aumento no seu tempo de vida (HOLLOSZY, 1992; MCKAY, CROWELL & MAYNARD, 1935; MASORO, 1992; WEINDRUCH, 1996; WEINDRUCH & SOHAL, 1997), e também melhorar alguns aspectos do Sistema Imunológico (BRADLEY, FRACP, FRCPA & XU, 1996; PAHLAVANI et alli, 1995; WEINDRUCH, 1996).

BAILEY et alli (1993) mostram que ratos submetidos à restrição calórica (RC) e atividade física durante toda a vida (RC crônica) diferiam dos ratos com alimentação *ad libitum* na quantidade de gordura corporal aos 12, 16, 20, 24 e 28 meses.

Em 1935, MCKAY et alli demonstraram que a RC em roedores provocou um atraso no desenvolvimento e prolongou o período de vida desses animais em 33%. Várias hipóteses tentam justificar este aumento da longevidade pela RC, dentre elas: o atraso no crescimento (MCKAY et alli, 1935), proteção contra a instalação da obesidade (HOLLOSZY 1992) e diminuição da taxa proliferativa celular, evitando o crescimento desordenado de células que poderiam levar ao câncer (WEINDRUCH, 1996).

Os experimentos realizados por WEINDRUCH e seu grupo iniciam a RC crônica em roedores e macacos em diferentes etapas da vida: em animais jovens (LANE, BAER, RUMPLER, WEINDRUCH, INGRAN, TILMONT, CUTHLER & ROTH, 1996; WEINDRUCH, 1996; WEINDRUCH & SOHAL, 1997); adultos (LASS, SOHAL, WEINDRUCH, FORSTER & SOHAL, 1998; RAMSEY, ROECKER, WEINDRUCH & KEMNITZ, 1997); e envelhecidos (ASPINES, LEE, WEINDRUCH, CHUNG, ROECKER & AIKEN, 1997; HARPER, MONEMDJOU, RAMSEY & WEINDRUCH, 1998; KIM, AIKEN, HAVIGHURST, HOLLANDER, RIPPLE & WEINDRUCH, 1997; WEINDRUCH & SOHAL, 1997;); e com isso procuram verificar a expectativa de vida dos animais, assim como a incidência de patologias ligadas ao envelhecimento.

Em humanos, devido à dificuldade experimental, ainda não se tem resultado longitudinal que mostrem o efeito da RC no tempo total de vida. Um estudo realizado com moradores da ilha de Okinawa no Japão mostra que a diminuição da ingestão calórica entre estes indivíduos, com a provisão necessária de nutrientes, pode estar relacionada à alta taxa de longevidade encontrada, fazendo com que eles passem dos 100 anos de idade (WEINDRUCH, 1996). Além disso, alguns estudos indicam que certos

tipos de câncer (mama, cólon e estômago) ocorrem com menor frequência em pessoas que ingerem menor quantidade de calorias (WEINDRUCH, 1996).

Além do seu efeito crônico, a RC oferecida por curtos períodos (quatro a oito semanas) também se mostrou capaz de alterar as funções do sistema imunológico, assim como a composição corporal dos animais estudados. HISHINUMA, NISHIMURA, KONNO, HASHIMOTO & KIMURA (1988) mostraram que a restrição calórica de 40% (sobre a ingestão do grupo controle) por um período de oito semanas em camundongos da cepa C3H/He, resultou na diminuição do peso dos órgãos linfóides, mas em contrapartida aumentou a porcentagem de proliferação de linfócitos T no timo, quando estas células foram cultivadas em presença do mitógeno Concanavalina A (ConA), e também aumentou a resposta imunológica das células do baço. Dessa forma a RC pode contribuir para a restauração dos parâmetros imunológicos reduzidos com o envelhecimento.

A RC de curto período, no envelhecimento, também é utilizada como forma de manipulação dietética no tratamento para obesidade (AZAIN, HAUSMAN, KASSER & MARTIN, 1995; KATZEFF, OJAMAA & KLEIN, 1995). A utilização da RC por quatro semanas tem demonstrado efeitos importantes sobre a redução do conteúdo de gordura corporal dos animais, conforme demonstrado por MACHADO, NOGUEIRA & CARPINELLI (1992), MACHADO (1997), PAPA, SERAPHIM & MACHADO (1997) e SERAPHIM (1996), segundo os quais, a RC à 50% com duração de quatro semanas em ratos Wistar (12 meses de idade) resultou na diminuição de 20% do peso corporal e melhorou o quadro de resistência periférica à insulina, processo acentuado com o aumento da idade.

3.5 *Envelhecimento & exercício físico*

3.5.1 *Composição corporal*

O exercício de caráter aeróbio pode auxiliar na perda de gordura corporal e preservação da massa muscular, e desta forma contribuir para a prevenção das doenças de risco (ACSM, 1994; McARDLE et alli, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993).

No exercício de longa duração e intensidade baixa à moderada caracterizada pela realização de trabalho na faixa entre 60 a 80% da FC máx ou 50 a 75% VO_2 máx (ACSM, 1994; McARDLE et alli, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993; WEINECK, 1991), tem-se como fonte energética o metabolismo aeróbio. Este envolve a completa redução da glicose a CO_2 e água, e ocorre dentro da mitocôndria, na presença de oxigênio (LEHNINGER, 1990; NEWSHOLME & LEECH, 1989; SALWAY, 1995).

Esta via se inicia com a oxidação do piruvato (produto final da glicólise) a acetil Coenzima-A (acetil-CoA) e Oxaloacetato (OAA).

Com a continuidade da atividade, apenas o estoque de glicogênio não é suficiente para manter o aporte energético, assim a célula muscular lança mão da utilização dos ácidos graxos livres (AGL) e aminoácidos (ACSM, 1994; McARDLE et alli, 1998; NEWSHOLME & LEECH, 1989; POLLOCK & WILMORE, 1993; TREMBLAY, SIMONEAU & BOUCHARD, 1994; WEINECK, 1991). Estes são precursores de metabólitos intermediários do Ciclo de Krebs, e dessa forma podem auxiliar na manutenção da demanda energética de atividades de longa duração.

Com o treinamento aeróbio ocorre um aumento considerável no número, tamanho e densidade das mitocôndrias (McARDLE et alli, 1998), assim como o aumento da quantidade e atividade das enzimas do Ciclo de Krebs, melhorando as condições para a utilização dos AGL como fonte energética, como ilustrado da FIGURA 2.

AGL = Ácidos graxos livres, CPT = *Carnitina palmitoil transferase*.

FIGURA 2– Participação dos ácidos graxos (AGL) no fornecimento de energia.

A maior ou menor taxa de utilização de AGL pelo organismo depende do estado de treinamento do indivíduo, sendo que indivíduos treinados utilizam ácidos graxos mais rapidamente que indivíduos sedentários (RANALLO & RHODES, 1998).

Para a realização do exercício, o fornecimento de AGL pode ser proveniente dos depósitos de triglicérides intramusculares e do tecido adiposo, e sua mobilização depende também do estado nutricional do indivíduo (HARGREAVES, 1995). Outras fontes lipídicas como as lipoproteínas também podem fornecer substrato energético para o exercício (MARTIN III, 1996), como mostrado na FIGURA 3.

AGL = Ácidos graxos livres, AGL-alb= Ácidos graxos ligados a albumina, CK = Ciclo de Krebs, CPT = *Carnitina Palmitoil transferase*, FABP = Proteína ligadora de ácidos graxos, LLP = *Lipase lipoproteica*, TG = Triglicérides.

FIGURA 3 – Fontes de AGL para o músculo esquelético.

A lipólise do tecido adiposo é uma importante via para o fornecimento de AGL para o metabolismo oxidativo no músculo esquelético (ABUMRAD, PERKINS, PARK & PARK, 1981; RANALLO & RHODES, 1998).

A quebra dos triglicérides para o fornecimento de AGL é estimulada principalmente pelas catecolaminas que durante o exercício estão em concentrações elevadas na circulação (CALLES-ESCANDÓN & DRISCOLL, 1994; FAIN & GARCIA-SAINZ, 1983). Esses hormônios estimulam a *triacylglycerol lipase* (*LHS*) (NEWSHOLME & LEECH, 1989; YEMAN, 1990), que passa da forma inativa para ativa, e desta forma dá início ao processo lipolítico, como ilustrado na FIGURA 4.

Existe um controle dinâmico entre a lipólise e a reesterificação do AGL no tecido adiposo. Durante o exercício submáximo prolongado,

quando a oxidação dos AGL circulantes pode aumentar cerca de 10 vezes, a razão de reesterificação pode diminuir de 70% (valor em repouso) para 25% (WOLFE, KLEIN, CARRARO & WEBER, 1990).

β1 = Receptor do tipo β1, LHS = Lipase homônio sensível, TG = Triglicérides, AG = Ácido graxo

FIGURA 4 – Atuação das catecolaminas na quebra de triglicérides nos adipócitos.

Devido à insolubilidade dos ácidos graxos em meio aquoso, estes se ligam à albumina quando se encontram no plasma, e dessa forma são transportados para os tecidos periféricos onde são metabolizados (NEWSHOLME & LEECH, 1989; POTTER, SORRENTINO & BERK, 1989; SALWAY, 1995).

As lipoproteínas circulantes também podem fornecer AGL para a oxidação na fibra muscular durante o exercício, e principalmente no período de recuperação (MARTIN III, 1996). Estas são captadas pela enzima lipoproteína lipase (LPL), que quebra os triglicérides liberando glicerol e ácidos graxos (FIGURA 3) (NEWSHOLME & LEECH, 1989; ROBINSON, 1970). Esta

enzima, também hormônio-sensível, é produzida no meio intracelular e transportada para o endotélio capilar para a quebra dos triglicérides encontrados no plasma (LAMBERT, WOODING, LAMBERT, KOESLAG & NOAKES, 1994; ROBINSON, 1970).

Sabe-se que com o treinamento há um aumento na quantidade e atividade máxima da enzima *LPL* do tecido muscular exercitado e uma diminuição no tecido adiposo (LAMBERT et alli, 1994; SEIP, ANGELOPOULOS, SEMENKOVICH, 1995; SIMSOLO, ONG & KERN, 1993). Isso mostra que o músculo treinado pode aumentar sua captação de AGL proveniente das lipoproteínas, e com isso promover sua oxidação (FIGURA 3).

A forma como o AGL entra na célula ainda é muito discutida; o transporte passivo é justificado por muitos autores pela característica lipídica da membrana, que desta forma facilitaria o processo de difusão (BRAUER & PESSOTI, 1949). Outros autores, no entanto, acreditam que exista um transportador de membrana específico para os AGL, pois a membrana celular é formada por uma bi-camada fosfolipídica que torna sua face extracelular polar, dificultando a passagem do AGL (apolar) (ABUMRAD, PERKINS, PARK & PARK, 1984; POTTER et alli, 1989; VAN NIEUWENHOVEN, VAN DER VUSSE & GLATZ, 1996; VEERKAMP, 1995).

Uma vez dentro da célula, os AGL circulam ligados às proteínas citoplasmáticas ligadoras de ácidos graxos (FAPB) (FIGURA 3) (GLATZ & VAN DER VUSSE, 1990). Estas facilitam o transporte dos AGL pelo citoplasma, protegendo enzimas e estruturas celulares dos efeitos tóxicos dos AGL, e também modulam a atividade enzimática, encaminhando o AGL para o seu destino metabólico (VAN NIEUWENHOVEN et alli, 1996).

A disponibilidade de outros substratos e a capacidade oxidativa do músculo esquelético interfere na utilização dos AGL, já que a falta de glicose pode comprometer a manutenção dos metabólitos intermediários do Ciclo de Krebs (HOPP & PALMER, 1990; TURCOTTE, HESPEL, GRAHAM & RICHTER, 1994). Assim, o efeito do treinamento aeróbio tem como

característica otimizar a utilização de AGL, em detrimento da utilização de outros substratos, como é o caso da glicose, que tem sua utilização poupada ao máximo e a neoglicogênese (formação de glicose pelo fígado através do lactato, alanina e glicerol) aumentada para manter a oxidação dos AGL. Por estes motivos é recomendada praticar exercícios aeróbios para a perda de gordura corporal (ACSM, 1994; McARDLE et alli, 1998; NEWSHOLME & LEECH, 1989; POLLOCK & WILMORE, 1993; WEINECK, 1991).

3.5.2 *Sistema imunológico*

Nos últimos anos, alguns autores têm mostrado que o exercício físico também pode alterar a resposta imunológica durante o envelhecimento (FIELDING & EVANS, 1997). HIROKAWA (1997) coloca o exercício como uma das manipulações para reverter e restaurar as funções imunológicas no envelhecimento, melhorando o quadro de infecções, desordens auto-imunes e malignidades (SHINKAI, KONISH & SHEPHARD, 1997). FIELDING & EVANS (1997) mostram que o exercício seria uma maneira de equilibrar a diminuição da resposta imunológica do organismo, que de certa forma contribui para a morbidade e mortalidade da população idosa (BRADLEY et alli, 1996).

Apesar destes achados, a literatura mostra controvérsias quanto às alterações do sistema imunológico promovidas pelo exercício. Isso se deve ao fato de que o exercício promove adaptações diferenciadas quanto a sua intensidade, duração, frequência e tipo (estático e dinâmico). De uma forma geral, estudos mostram que exercício de intensidade moderada leva a uma melhora da resposta imunológica (HIROKAWA, 1997; MACKINNON, 1998; NIEMAN, 1997; NIEMAN, MILLER, HENSEN, WARREN, GUSEWITCH, JOHNSON, DAVIS, BUTTERWORTH, HERRING & NEHLSSEN-CANNARELLA, 1994; SHEPHARD, RHIND & SHEK, 1994), como podemos verificar na FIGURA 5, adaptada de PEDERSEN, ROHDE & OSTROWSKI, 1998.

ITRS = Infecções do trato respiratório superior.

FIGURA 5 – Modelos de susceptibilidade a infecção.

Podemos observar na FIGURA 5 que: a) Durante exercício moderado a intenso, a resposta imunológica está aumentada (como mostrado pela atividade das "Natural Killers" – NK), mas o exercício intenso é seguido por um período de imunossupressão durante o qual há uma abertura para patógenos oportunistas ("open window"); b) A curva com formato em

“J” descreve o conceito da relação das infecções do trato respiratório superior (ITRS) com a prática de exercício físico, no qual há uma diminuição nos indivíduos que praticam exercício moderado e um aumento naqueles que estão em “overtraining” (super treinamento), quando comparados a sedentários (BRINES, HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN, 1996). Assim, o exercício moderado é indicado para pessoas idosas como forma de restaurar a imunodepressão causada pelo envelhecimento (SHEPHARD, 1998; SHINKAI et alli, 1997; VENKATRAMAN, & FERNANDES, 1997).

No exercício de baixa à moderada intensidade ocorre um aumento da concentração plasmática das citocinas: IL-2, IL-6, TNF, Interferon- γ e também da IL-1 no músculo (PEDERSEN & BRUUNSGAARD, 1995). Estes fatores são capazes de modular de forma positiva a resposta imunológica, como é o caso da IL-2, produzida por linfócitos T, que atua como promotora do crescimento nos linfócitos e estimula a citotoxicidade das células NK (PLAYFAIR, 1996). No QUADRO 3 encontramos mais algumas alterações em resposta ao exercício agudo, observadas no envelhecimento (adaptado de SHEPHARD, 1997).

QUADRO 3 – Influência do envelhecimento sobre a resposta imunológica no exercício agudo.

- Migração dos linfócitos para os compartimentos vasculares
- Menor estimulação na proliferação de linfócitos pelo exercício moderado
- Menor atenuação na proliferação de linfócitos pelo exercício exaustivo
- Reduzida tolerância aos radicais livres
- Aumento da vulnerabilidade a lesões e resposta de fase aguda
- Resposta das NK como em indivíduos adultos

Durante a execução do exercício moderado SHINKAI, SHORE, SHEK & SHEPHARD (1992) encontraram linfocitose e granulocitose, sendo que após o exercício observaram maior aumento da granulocitose acompanhada de linfopenia.

Como mostrado no QUADRO 3, a linfocitose é caracterizada principalmente pelo aumento das NK, seguido das células T CD8⁺ e CD4⁺ e linfócitos B (SHINKAI et alli, 1997). A mobilização destas células induzida pelo exercício é dependente da expressão dos receptores β adrenérgicos, existentes nos respectivos tipos celulares (LANDMANN, 1992).

Apesar destes trabalhos, pouco se sabe sobre a atuação direta do exercício aeróbio sobre o metabolismo de macrófagos e linfócitos, durante o processo de envelhecimento. No quadro a seguir (QUADRO 4) encontramos um resumo das principais alterações da idade sobre o exercício e a função imunológica (adaptado de VENKATRAMAN & FERNANDES, 1997)

QUADRO 4 – Influência do envelhecimento e do exercício sobre a função imunológica.

Variáveis estudadas	Condições	Alterações com a idade
Produção de anticorpos a antígenos específicos	Repouso x Treinamento (Ratos)	↓ com a idade, sem efeito
Atividade da NK	Repouso x exercício agudo (Humanos)	↑ com treinamento, em repouso e após o exercício, comparado ao grupo controle com a mesma idade
Proliferação (PHA) ¹	Repouso, exercício agudo x treinamento (Camundongos)	↓ com idade/exercício, ↑ com treinamento
Incidência de tumores	Esteira (Camundongos)	↑
Atividade de NK	Repouso x exercício agudo (Humanos)	Nenhuma mudança com a idade
Proliferação (ConA), produção de IL-2, citotoxicidade	Repouso x treinamento (Ratos)	↓ com idade, ↓ com treinamento em jovens e meia idade, mas não em velhos
NK e função da célula T	Repouso x treinamento (Humanos)	↑ em idosos altamente treinados.
Função das células T	Repouso x treinamento (Humanos)	↓ com idade, ↑ com treinamento

¹ PHA = mitógeno phitohemaglutinina.

4 METODOLOGIA

4.1 *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar, machos, mantidos em biotério com ciclo invertido claro/escuro de 12/12 horas, com início do período claro às 19 horas, temperatura ambiente 22 ± 2 °C e umidade relativa a 60%, do Departamento de Histologia no Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

4.2 *Descrição dos grupos experimentais*

No esquema a seguir estão representados os grupos experimentais estudados:

4.2.1 *Ratos adultos (AD)*

Ratos com dois meses de idade caracterizados como 'adultos jovens' e mantidos em gaiolas coletivas com, no máximo, cinco animais por gaiola.

4.2.2 *Ratos envelhecidos*

4.2.2.1 *Envelhecidos (ENV)*

Ratos com idade entre 15 a 18 meses (GOMMERS, DEHEZ-DELHAYE & CAUCHETEUX, 1983) mantidos em gaiolas individuais durante o período do experimento.

4.2.2.2 *Emagrecidos*

4.2.2.2.1 *Restrição calórica (RC)*

Ratos com idade entre 15 a 18 meses, submetidos, durante seis semanas (RC-6), à restrição calórica. Durante o experimento, estes animais foram mantidos em gaiolas individuais.

A escolha do termo 'restrição calórica' utilizado no projeto, baseou-se nos trabalhos de AZAIN et alli (1995), que utilizam o termo "*feed restriction*"; BROWNLOW, PARK, SCHWARTZ & WOODS (1993), "*food restriction*"; HISHINUMA et alli (1988), "*dietary restriction*"; KATZEFF et alli (1995), "*energy restriction*"; MACHADO et alli (1992), "*caloric restriction*"; MACHADO (1997), "restrição calórica"; PAPA et alli (1997), "*food restriction*" e SERAPHIM (1996), "restrição calórica". Todos estes autores submeteram seus grupos experimentais às dietas por um período inferior a seis semanas (90 dias), com a finalidade de promover redução aguda na massa de gordura.

Outros grupos de pesquisa também utilizam o termo restrição calórica para experimentos realizados ao longo de toda a vida do animal, como é observado nos trabalhos de WEINDRUCH (1996). Na grande maioria, estes trabalhos estudam os mecanismos que levam ao aumento da expectativa de vida provocado pela restrição calórica.

4.2.2.2 Exercício aeróbio (EX)

Ratos com idade entre 15 a 18 meses submetidos, durante seis semanas, ao treinamento em natação, segundo protocolo adaptado de LANCH A JUNIOR (1993). Durante o experimento, estes animais foram mantidos em gaiolas individuais.

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Padrão alimentar

Todos os animais receberam ração 'NUVILAB CR 1' (Nuvital ®) sendo que para os grupos AD, ENV e EX, a ração foi oferecida *ad libitum*.

Os animais submetidos à RC-4 e RC-6 receberam o equivalente a 50% da ingestão *ad libitum*, quantificada previamente na semana antecedente ao período experimental, como indicado nos trabalhos de BROWNLOW et alli (1993) e KATZEFF et alli (1995).

Para estes animais a ração foi oferecida uma vez ao dia, em diferentes horários, ficando disponível por tempo indeterminado, segundo SERAPHIM (1996). A seguir encontra-se esquematizado o padrão alimentar dos animais sob submetidos à restrição calórica por quatro ou cinco semanas:

Em todos os grupos foi determinado o consumo de ração pela diferença entre a ração oferecida e a ração não ingerida.

Para todos os grupos foi oferecido água *ad libitum* sendo, uma vez por semana, adicionado o suplemento vitamínico 'VITAGOLD POTENCIADO

para uso veterinário' (*TORTUGA* ®) na concentração à 9 ml / 1 L de água, durante o período equivalente ao experimento (seis semanas).

A suplementação foi oferecida a todos os animais com o intuito de minimizar uma possível deficiência vitamínica, que poderia ser potencializada pelo regime de restrição calórica. Este fato se torna importante ao considerarmos que a carência de algumas vitaminas pode influenciar a resposta imunológica (BRADLEY et alli, 1996).

4.3.2 *Controle de peso*

Durante o período experimental, os animais foram pesados uma vez por semana.

O peso final dos animais corresponde àquele medido na última semana do período experimental (4ª ou 6ª semana).

Para o cálculo do peso relativo dos tecidos, foi utilizado o peso realizado imediatamente antes do sacrifício, após 8 a 12 horas de jejum.

4.3.3 *Índice de Lee*

Para medida do grau de obesidade calculou-se o *Índice de Lee*, que correlaciona a raiz cúbica da massa corporal em gramas, com a medida do comprimento naso-anal em milímetros (BERNARDIS & PATTERSOON, 1968), como ilustrado a seguir:

$$\text{Índice de LEE} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso}}}{\text{comprimento}}$$

4.3.4 *Protocolo de treinamento*

O treinamento correspondeu ao protocolo descrito por LANCHÁ JUNIOR (1993) que foi adaptado para ratos envelhecidos. Durante seis semanas os animais foram treinados no início do período claro (entre 19-21

horas), por no máximo uma hora, cinco dias por semana e com sobrecarga atada à cauda¹ equivalente a, no máximo, 2% do peso corporal do animal. A primeira semana de treinamento serviu para a adaptação dos animais ao meio líquido, sendo a sobrecarga e o tempo de treinamento progressivamente elevados, como ilustrado no QUADRO 5.

QUADRO 5 – Representação esquemática do protocolo de treinamento.

	2ª feira	3ª feira	4ª feira	5ª feira	6ª feira
1ª semana	15m / 0%	20m / 0%	30m / 0%	30m / 0,5%	40m / 0,5%
2ª semana	40m / 0,5%	40m / 1%	40m / 1%	50m / 1%	50m / 1%
3ª semana	50m / 1%	50m / 1,5%	50m / 1,5%	60m / 1,5%	60m / 1,5%
4ª semana	60m / 1,5%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%
5ª semana	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%
6ª semana	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%	60m / 2%

tempo = minuto (m), sobrecarga = %.

O treinamento foi realizado em sistema de natação, constituído por tanques com água circulante e temperatura constante a 31 °C (± 2 °C), desenvolvido por VIEIRA, HAEBISCH, KOKUBUN, HELL & CURI (1988) (FIGURA 6).

¹ A sobrecarga foi corrigida semanalmente pelo peso corporal do animal.

Figura 6 – Fotos do sistema de natação para ratos.

4.3.5 *Sacrifício*

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, no período da manhã, entre 7 e 11 horas, sendo estes animais privados de ração por um período equivalente a 8 -12 horas, estabelecendo assim um estado metabólico semelhante para todos.

4.4 *Determinações*

No QUADRO 6 encontram-se esquematizadas as determinações realizadas neste estudo.

QUADRO 6 – Representação dos experimentos realizados nos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX).

Composição corporal	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Progressão de Peso ➤ Consumo de ração ➤ Peso dos tecidos ➤ Quantificação de lípides ➤ Quantificação de proteína ➤ % de gordura
Parâmetros avaliados no músculo	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Citrato sintase
Parâmetros séricos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Glicose ➤ Insulina ➤ Índice Glicose/Insulina ➤ Cortisol, corticosterona ➤ Testosterona, GH ➤ Glutamina ➤ Albumina ➤ Citocinas: IL-1, IL-2 e IL-6 ➤ Imunoglobulinas: IgA e IgG
Macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Capacidade fagocitária ➤ Produção de H₂O₂ ➤ Consumo e produção de substratos
Linfócitos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Capacidade proliferativa ➤ Consumo e produção de substratos

4.4.1 *Composição corporal e metabolismo lipídico*

4.4.1.1 *Quantificação do conteúdo lipídico*

4.4.1.1.1 *Sítios avaliados*

Determinou-se o peso total e conteúdo lipídico dos seguintes sítios corporais: tecido adiposo epididimal (TAE), tecido adiposo retroperitoneal (TARP), tecido adiposo mesentérico (TAME), tecido adiposo marrom (TAM), fígado (FIG), carcaça² (CARCAÇA), músculo solear (SÓLEO), músculo gastrocnêmio (GASTRO) e músculo extensor digitório longo (EDL).

4.4.1.1.2 *Tratamento das amostras*

No sacrifício, os tecidos foram retirados na sua totalidade, resfriados e congelados. No dia da extração lipídica as amostras foram descongeladas e pesadas na sua totalidade, sendo apenas 1 grama de cada tecido separado para análise.

A carcaça foi submetida ao cozimento em autoclave durante 1 hora a 120 °C e pressão 1 Kgf/cm², e homogeneizada em água destilada 1:1 (p/v).

4.4.1.1.3 *Extração da fração lipídica*

Segundo método adaptado de STANSBIE, BROWNSEY, CRETAZZ & DENTON (1976), amostras de 1 g de tecido e 3 g de homogeneizado de carcaça foram saponificadas em KOH (30% p/v) a 70 °C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 3 ml de etanol absoluto e as amostras foram aquecidas a 70 °C por duas horas. Após o resfriamento e acidificação com 2,5 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 6N), os lípidos foram extraídos através de agitação por 10 minutos com 8, 6 e 4 ml de éter de petróleo,

² A carcaça constitui a sobra do animal após a retirada dos sítios utilizados para análises.

respectivamente. A fração de éter de petróleo contendo os lípides foi lavada com 2 ml de água destilada, sendo seu conteúdo final transferido para pequenos frascos de vidro, previamente pesados.

A massa de gordura presente na amostra do tecido, contendo principalmente ácidos graxos e colesterol, foi determinada pela diferença de peso dos frascos de vidro, após a evaporação do éter de petróleo.

Os dados foram expressos em gramas de tecido / 100 g de peso corporal, e em mg de lípides / g de tecido.

4.4.1.2 *Porcentagem de gordura corporal*

A porcentagem de gordura corporal foi calculada pelo somatório do peso dos tecidos adiposos (TAE, TARP, TAME, TAM) mais a quantidade de gordura presente na carcaça. Esse total foi relacionado ao peso corporal obtido no dia do sacrifício, fornecendo assim, o percentual de gordura dos animais estudados.

4.4.2 *Parâmetros avaliados no músculo esquelético*

No músculo Gastrocnêmio (GASTRO) para estudo do efeito do treinamento aeróbio foi determinada a atividade máxima da enzima Citrato Sintase - CS.

Para tanto o músculo foi homogeneizado em tampão PBS na proporção 1:10 (p/v) e uma alíquota armazenada para a dosagem de proteínas.

4.4.2.1 *Citrato sintase - CS (E.C. 4.1.3.7)*

A *Citrato Sintase* é uma importante enzima do Ciclo de Krebs, sendo responsável pela entrada de carbono neste ciclo, e catalisa a reação:

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo ALP, NEWSHOLME & ZAMMIT (1976) modificado, a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio:

O tampão consistiu de Tris-aminometano 50 mM, EDTA 1 mM; DTNB 0,2 mM; Acetil-CoA 0,1 mM e Triton X-100 0,05% (v/v), ao qual foi adicionado 0,1 ml de homogeneizado. O volume total do ensaio foi de 1 ml e o pH 8,1. A reação iniciou-se pela adição de Oxaloacetato 0,5 mM ao meio e a leitura realizada a 25 °C, em intervalo de 10 minutos em 412 nm.

4.4.3 *Parâmetros séricos*

4.4.3.1 *Tratamento do sangue*

Para as dosagens de substratos, hormônios e de citocinas, o SORO³ foi coletado após centrifugação do sangue a 1000 x g, 20 minutos a 4 °C; e congelado a -70 °C.

³ SORO – Obtido do sangue total após retração do coágulo (sem a presença de anticoagulantes).

4.4.3.2 Glicose

A glicose sérica foi determinada através de Kit enzimático, Método GOD-ANA, *Labtest Diagnóstica*.

A reação é baseada na fosforilação da glicose pela *hexoquinase*, formando a Glicose-6-P que é oxidada a 6-fosfogluconato através da enzima *glicose-6-fosfato desidrogenase*, produzindo NADH.

Os resultados estão expressos em mg de glicose / dl de soro.

4.4.3.3 Albumina

A quantidade de albumina presente no soro foi determinada pelo kit *BIOCLIN*, Quibasa Química Básica LTDA.

A dosagem utiliza o que se chama "erro protéico dos indicadores". Na presença de Albumina, o verde de bromocresol forma um complexo corado que exibe um espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre, permitindo assim a dosagem de albumina.

Os resultados estão expressos em g de albumina / dl de soro.

4.4.3.4 Glutamina

A concentração de glutamina foi determinada segundo método descrito por WINDMUELLER & SPAETH (1974) que utiliza as enzimas *asparaginase* e *glutamato desidrogenase* (GDh), segundo a reação:

O meio utilizado foi composto por KH_2PO_4 50mM, glicerol a 50%, NADH 4 mM, BSA 10%, *Glutamato desidrogenase* 5U/ml, α -cetoglutarato 4M, e *Asparaginase* 5U/ml.

4.4.3.5 *Insulina, corticosterona, testosterona e GH.*

Para a quantificação da Insulina, Corticosterona, Testosterona e GH séricos foram utilizados os Kits por radioimunoensaio COAT-A-COUNT®, DPC.

Os resultados estão expressos em μU de insulina / ml de soro; ng de corticosterona / ml de soro; ng de testosterona / dl de soro e ng de GH / ml de soro.

4.4.3.6 *Índice glicose / insulina*

Para a determinação indireta da resistência a insulina foi calculado o índice glicose / insulina, como descrito por CARO (1991):

$$\text{INDICE} = \frac{[\text{GLICOSE}]}{[\text{INSULINA}]}$$

4.4.3.7 *Interleucinas*

As INTERLEUCINAS IL-1, IL-2 e IL-6, presentes no soro, foram dosadas através dos Kits comerciais BIOTRAK – Amersham Life Science, e os resultados obtidos através de leitura em ELISA (SpectraMax plus, Molecular Devices).

Os resultados estão expressos em pg de interleucinas / ml de soro.

4.4.3.8 *Imunoglobulinas*

As imunoglobulinas A e G (IgA e IgG) foram quantificadas no soro através do kit por imunoprecipitação e leitura em ELISA, da linha *Master BIOCLIN*, Quibasa Química Básica LTDA.

Os resultados estão expressos em mg de imunoglobulinas / dl de soro.

4.5 *Determinações do sistema imunológico*

4.5.1 *Peso e conteúdo protéico dos órgãos linfóides*

Mediu-se o peso total e o conteúdo protéico dos órgãos Baço e Timo dos animais estudados.

Para a extração da fase protéica utilizou-se o método adaptado de FOLCH, LEES & SLOANE-STANLEY (1957), o Baço foi homogeneizado em água destilada na proporção 1:2 (p/v) e o Timo na proporção 1:5 (p/v).

Em 200 µl deste homogeneizado adicionou-se água destilada, metanol e clorofórmio (respectivamente 300 µl, 600 µl e 1100 µl). Esta mistura foi agitada, decantada (permanecendo em repouso por 60 minutos), e posteriormente centrifugada a 430 x g por 3 minutos. Após estes procedimentos, retirou-se a fase superior (contendo água, metanol e proteína), e repetiu-se o mesmo procedimento de extração na fase inferior (lipídica).

Na fase protéica foi realizada a dosagem de proteínas através do método de LOWRY, ROSEBRUOGH, FARR & RANDALL (1951).

Os dados estão expressos pelo peso em gramas do órgão / 100 g de peso corporal e mg de proteína / g de órgão.

4.5.2 *Obtenção de células*

4.5.2.1 *Macrófagos*

Os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal, após a decapitação dos animais, segundo método descrito por COSTA ROSA et alli (1993). Com a remoção da pele da região abdominal, 10 ml de PBS, pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade foi aberta e o fluido, contendo as células, aspirado com a utilização de pipeta *Pasteur* de plástico. Uma alíquota deste fluido foi retirada para contagem total das células e para o teste de viabilidade celular, com azul de *Trypan* 1% (em PBS). As amostras continham células com viabilidade superior a 96%.

A suspensão, contendo PBS e macrófagos, foi centrifugada a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C.

4.5.2.2 *Linfócitos*

Os linfócitos foram obtidos dos linfonodos mesentéricos de acordo com metodologia adaptada de ARDAWI & NEWSHOLME (1982) e detalhada por VIEIRA, NASCIMENTO, ARIZAWA & CURI (1990).

Após a coleta dos linfonodos foi retirado cuidadosamente o tecido adiposo que envolve os mesmos, tendo-se cuidado para evitar a contaminação. Para a liberação dos linfócitos, os tecidos foram prensados em malha de aço inox na presença de tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4. A suspensão, contendo PBS e linfócitos, foi filtrada (filtro Whatman 105 cat. N. 2105 841 filter, UK) e centrifugada a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C.

A população celular obtida através deste procedimento constitui-se de 60% de linfócitos T e 40% de linfócitos B, sendo a contaminação por macrófagos menor que 1% (ARDAWI & NEWSHOLME, 1982; NELSHOLME, GORDON & NEWSHOLME, 1987; VIEIRA et alli, 1990).

As células foram contadas em microscópio de luz com auxílio da câmara de *Neubauer*, coradas na proporção de 1:1 (v/v) com azul de *Trypan* 1%.

4.5.3 *Análises funcionais*

4.5.3.1 *Fagocitose por macrófagos*

4.5.3.1.1 *Obtenção e opsonização de zimozan*

Para aumentar o reconhecimento pelos macrófagos, as partículas de zimozan foram previamente opsonizadas, como descrito por COSTA ROSA et alli (1993).

A suspensão inicial de zimozan continha 250 g de *Sacharomyces cerevisiae* dissolvidos em 100 ml de salina, com concentração final equivalente a 50 - 57 mg zimozan/ ml de suspensão.

Para a opsonização, esta suspensão foi diluída 10 vezes em PBS (pH 7,2) e passada três vezes em seringa estéril com agulha fina. O material foi incubado com soro obtido de ratos normais, na proporção 1:10, a 37°C, com agitação. Após 30 minutos, foi centrifugado a 150 x g por 15 minutos, e o precipitado ressuspenso em PBS. Este procedimento final foi repetido por 3 vezes.

4.5.3.1.2 *Avaliação da capacidade fagocitária*

Em *Erlenmeyers* de 25 ml previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona), avaliou-se a capacidade fagocitária dos macrófagos peritoneais. Estes foram incubados (em igual volume) com solução contendo partículas de zimozan opsonizadas, por 60 minutos, a 37°C, sob agitação; em 1ml de meio composto por: PBS, glicose 5mM, glutamina 2mM e 2% de albumina livre de gordura (BSA).

Após a incubação, uma alíquota do meio foi retirada para a realização da contagem de células e determinação da porcentagem de fagocitose; avaliada em microscópio de luz, após a diluição da amostra em PBS (1:10, v/v) e solução azul de *Trypan* (1:2, v/v). Para a determinação da porcentagem de fagocitose, foram considerados apenas os macrófagos que englobaram três ou mais partículas.

Os resultados estão expressos em porcentagem de fagocitose.

4.5.3.2 *Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos*

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi medida utilizando-se o método descrito por PICK & MIZEL (1981) modificado.

Erlenmeyers de 25 ml foram previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona) para evitar a aderência dos macrófagos.

Após a retirada de uma alíquota para contagem de proteína, as células foram incubadas em 1 ml de meio, composto por: PBS, 2% albumina livre de gordura (BSA), glicose 5mM, glutamina 2mM, *fenol red* 0.56 mM, 100 μ l PMA (*Phorbol-myristate-acetate* 100 μ g / ml PBS) e 100 μ l *Peroxidase* (1 mg / 2 ml PBS); em uma atmosfera de 5% CO_2 : 95% ar, a 37 °C.

A formação de peróxido de hidrogênio foi interrompida com a adição de 20 μ l de NaOH 1 N, e após 15 minutos, o total produzido foi quantificado em espectrofotômetro (*HITACHI* U-2001) a 620 nm.

Os resultados estão expressos em nmol H_2O_2 / 1 hora x mg de proteína⁻¹.

4.5.3.3 *Proliferação de linfócitos*

Para a determinação da proliferação de linfócitos foram utilizadas as células obtidas do sangue total e presente no linfonodo mesentérico.

4.5.3.3.1 Células obtidas a partir do sangue total

O sangue utilizado para proliferação de células foi coletado em tubos heparinizados (0,2 mg / ml de sangue) e diluído em meio de cultura RPMI 1640 e antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg / ml e penicilina 2,5 U/ml, GIBCO); na proporção 1:10 (v/v). As células foram semeadas e submetidas aos procedimentos descritos para a proliferação de células (item 4.5.3.3.3.).

4.5.3.3.2 Células do linfonodo mesentérico

Após a obtenção dos linfócitos (como descrito anteriormente no item 4.5.2.2.), estes foram manipulados no fluxo laminar estéril e ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 estéril, sendo novamente centrifugados a 150 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após esta última centrifugação, o 'pellet' formado foi ressuspenso em 1 ml de meio RPMI 1640, do qual retirou-se uma alíquota de 100 µl para a contagem de células. O restante foi diluído em solução estéril contendo meio RPMI 1640, 10% de soro fetal bovino, antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg / ml e penicilina 2,5 U / ml) e glutamina 2 mM.

4.5.3.3.3 Proliferação de células

As células foram semeadas em placas de 96 Wells (*CORNING*, NY, USA), com 5×10^5 células por 'Well', estimuladas com os mitógenos para linfócitos T e B, 20 µl de Concanavalina -A (ConA, 5 µg / ml, CALDER, COSTA ROSA & CURI, 1995) e 20 µl de Lipopolissacarídeos (LPS, 20 µg/ ml, PARRY-BILLINGS, LEIGNTON, DIMITRIADIS & DE VASCONCELOS, 1989), respectivamente. As células foram mantidas a 37 °C, sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar.

Após o período de 48 horas de cultivo as células receberam 20 µl de solução contendo 0,2 µCi de [2-³H] - Timidina (portanto, concentração final de 0,02 µCi / 'Well'). Dezoito horas depois, foram coletadas

automaticamente por coletor múltiplo (*Skatron Combi* Multiple Cell Harvester, UK) em papéis-filtro cat. N° 11731 (*Skatron Combi*, Suffolk, UK).

O esquema a seguir ilustra o período total da cultura de células:

Os discos de papel-filtro, contendo a radioatividade incorporada ao DNA das células, foram mergulhados em 1 ml de líquido de cintilação *EcoLume™ (ICM)* e, após 24 horas, a radiação incorporada foi determinada em contador Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2100TR, *Packard*.

Os dados estão expressos pelo índice de proliferação, no qual os valores em CPM (Contagem por minuto) obtidos para as células estimuladas pelos mitógenos são divididos pelos valores encontrados para as células não estimuladas (controle), como ilustrado a seguir:

$$\text{ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO} = \frac{\text{CPM}_{\text{mitógenos}}}{\text{CPM}_{\text{controle}}}$$

4.5.4 *Parâmetros metabólicos*

4.5.4.1 *Consumo e produção de substratos (incubação)*

A determinação do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato, glutamato e aspartato foram realizadas após incubação de macrófagos ou linfócitos por 1 h a 37 °C, em *banho-maria* com agitação e atmosfera de 5% CO₂: 95% ar.

O meio de incubação foi composto por PBS, albumina livre de gordura em concentração final de 2% e 100 μ l de substrato: 5 mM de Glicose ou 2 mM de Glutamina.

Após 1 h foi adicionado 0,2 ml de ácido tricloroacético (TCA) a 25%, e em seguida o material foi centrifugado a 16000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e neutralizado com solução TRIS/KOH 0,5M. Todas as amostras foram congeladas a -70 °C para posteriores determinações.

Os substratos foram determinados a partir de 100 μ l do sobrenadante neutralizado, e estão expressos em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹.

4.5.4.1.1 Determinações dos substratos

4.5.4.1.1.1 Glicose

O conteúdo de glicose presente no meio, após a incubação, foi determinada através do Kit enzimático LABTEST (*Hexoquinase* e *Glicose 6 fosfato desidrogenase, G-6-PDh*), segundo a reação:

4.5.4.1.1.2 Lactato

O conteúdo de Lactato foi determinado segundo o método descrito por ENGLE & JONES, 1978, que consiste na conversão de lactato a piruvato através da enzima *Lactato desidrogenase (LDh)*. Neste processo há o consumo de NAD⁺ e formação de NADH (proporcional ao conteúdo de lactato), como ilustrado no esquema a seguir:

O meio de ensaio foi constituído por glicina 0,55 mM, EDTA 11,3 mM, hidrato de hidrazina 0,7 M, e NAD^+ 0,43 mM, pH 8,85. Utilizou-se o hidrato de hidrazina para impedir a reversão da reação, através da formação de lactato a partir do piruvato. A reação foi iniciada com a adição da enzima *LDh* [100 mg /ml], e após 1 hora em temperatura ambiente, mediu-se a absorbância em 340 nm.

4.5.4.1.1.3 *Glutamina*

O consumo de Glutamina foi determinado segundo método descrito por WINDMUELLER & SPAETH (1974), descrito anteriormente no item 5.4.3.4.

4.5.4.1.1.4 *Glutamato*

O conteúdo de Glutamato foi determinado segundo método descrito por BERNT & BERGMEYER (1974). A enzima *glutamato desidrogenase* (*GDh*) catalisa a reação produzindo α cetoglutarato e NADH, a partir do Glutamato e NAD, sendo a formação de NADH proporcional ao conteúdo de glutamato utilizado, como ilustrado na figura a seguir:

O meio de ensaio foi composto pelo tampão glicina-hidrazina (glicina 0,5 M e hidrazina 0,4 M), NAD^+ 7,5 mM, ADP 10,6 mM e água deionizada (pH final 9,0). O início da reação ocorreu com a adição da enzima *GDh* (4 U / ml), e após 1 hora a temperatura ambiente a absorbância foi medida a 340 nm.

4.5.4.1.1.5 Aspartato

O conteúdo de Aspartato foi determinado segundo método indireto descrito por BERGMEYER, BERNT, MÖLERING & PFLEIDER, 1974.

Este pode ser dividido em duas partes. Na primeira há produção de Oxaloacetato (OAA) e glutamato a partir do Aspartato e α -cetoglutarato, através da reação catalisada pela enzima *Transaminase glutâmica oxaloacética (TGO)*, como ilustrado no esquema a seguir:

Na segunda parte há produção de malato e NAD^+ a partir do OAA e NADH, catalisada pela enzima *Malato desidrogenase (MDh)*. O consumo de NADH é proporcional à quantidade de OAA formado que corresponde ao conteúdo de aspartato, segundo a reação:

O meio de ensaio (pH 7,5) foi composto por K_2HPO_4 63 mM, KH_2PO_4 63 mM, α -cetoglutarato 3 mM, NADH 0,08 mM e *Malato desidrogenase* 6U/ml. A reação foi iniciada após a adição da enzima *glutamato-oxaloacetato-transaminase* 4UI/ml.

4.6 Determinações gerais

4.6.1 Glândulas adrenais

Foram retiradas e pesadas logo após o sacrifício dos animais.

4.6.2 *Concentração de proteína*

Utilizou-se a metodologia descrita por LOWRY et alli (1951) para os homogeneizados de tecidos e amostras celulares, sendo seus valores comparados à curva padrão de albumina. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares com posterior reação com o reagente colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*. A leitura foi realizada a 750 nm em espectrofotômetro *HITACHI* U-2001.

4.6.3 *Retirada de ácidos graxos da albumina bovina*

Todo o conteúdo de gordura da albumina sérica bovina, fração V (Sigma), foi retirado, de acordo com método adaptado de CHEN (1967).

Lavaram-se 10 g de carvão ativado através de sucessivas decantações em água deionizada, retirando-se o sobrenadante por aspiração a vácuo. O carvão lavado foi adicionado a solução de albumina a 20% (em água deionizada), sob agitação. A solução formada foi acidificada pela lenta adição de HCl 10 N, e posterior agitação a 4 °C por 1 hora.

A remoção do carvão ocorreu pela filtragem em papel *Whatman* Nº 1 em funil de *Buchner* e sucessivas centrifugações a 1000 x g. A solução filtrada foi neutralizada pela adição de KOH 10 N e dialisada em NaCl 0,9% a 4 °C por 24 horas. Finalmente, adicionou-se água deionizada para obtenção da concentração final de 10%.

4.7 *Leituras*

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (*HITACHI* U-2001) e leitor ELISA (*SpectraMax plus*, *Molecular Devices*), quando as amostras foram realizadas em microensaio.

4.8 Soluções

Composição do PBS em água destilada, pH 7,4 a 25 °C.

NaCl	0,12 Mm
Na ₂ HPO ₄ anidro	10 mM
KH ₂ PO ₄ anidro	3,2 mM

4.9 Reagentes, enzimas e compostos radioativos

Os reagentes constituintes dos tampões foram obtidos da SYNTH, Labsynth Produtos para laboratórios Ltda, ICN Biomedicals INC., AMRESCO, Sigma e Mallinckrodt Baker, S.A.

NADP, NAD, NADH, Coenzima A, Creatina Fosfato, Creatina Fosfoquinase, PMA, LPS, Concanavalina foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co.

O composto radioativo [²H]-Timidina foi obtido da AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH.

O meio de cultura RPMI 1640 foi obtido da GIBC BRL, Life Technologies™.

ATP, ADP, α -cetoglutarato, *Lactato desidrogenase*, *peroxidase* e antibiótico (estreptomicina e penicilina) foram obtidos da AMRESCO.

As enzimas *Glicose 6 fosfato desidrogenase*, *Hexoquinase* e *Asparaginase* e o líquido de cintilação EcoLume foram obtidos da ICN Biomedicals INC.

A enzima *Glutamato desidrogenase* foi obtida da Boehringer Mannheim.

4.10 *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada com apoio do CEA – Centro de Análise Estatística do Instituto de Matemática e Estatística – USP.

Os dados foram analisados através dos testes Teste *t de student* e Análise de Variância (ANOVA), este último seguido dos testes paramétricos Tukey, para comparação entre todos os grupos avaliados, ou Dunnet, para comparação com o grupo Adulto (AD) ou Envelhecido (ENV).

Em experimentos onde o número de amostras foi inferior a cinco, utilizou-se (após ANOVA) o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O nível de significância foi fixado à $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na forma de média, erro padrão da média (EPM) e seu respectivo número de amostra (n) para cada grupo avaliado. Estão ordenados segundo o QUADRO 6, sendo primeiramente comentadas as alterações encontradas no envelhecimento, seguida dos protocolos de emagrecimento.

5.1 *Composição corporal*

5.1.1 *Progressão do peso corporal*

Com o avanço da idade podemos observar um aumento do peso corporal em cerca de 74% nos animais ENVELHECIDOS (ENV) em relação aos animais ADULTOS (AD), como ilustrado na FIGURA 7.

Quanto à evolução de peso dos animais ENVELHECIDOS durante as 6 semanas de experimento, observou-se apenas uma variação de 4% no peso final quando comparado ao inicial (FIGURA 7).

Com os protocolos de emagrecimento observamos uma diminuição do peso corporal dos animais RC-4, RC-6 e EX, equivalente a 23%, 19% e 14% respectivamente (FIGURA 7).

Estes protocolos foram capazes de reduzir após as seis semanas de experimento 14%, 19% e 8%, respectivamente, do peso corporal inicial em cada grupo.

5.1.2 *Consumo de ração*

Apesar da diferença de peso encontrado nos animais ENVELHECIDOS, não foi observada nenhuma diferença no consumo de ração quando comparado ao consumo dos animais ADULTOS, ilustrado na FIGURA 8.

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

£ $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

¢ $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos no INÍCIO do período experimental.

FIGURA 7 - Progressão do peso corporal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média de peso semanal em gramas (g) $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO I.

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

& $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

FIGURA 8 - Consumo diário de ração dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro e seis semanas (RC-4/6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média do consumo de ração em gramas (g) $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO II.

A restrição calórica oferecida por quatro e seis semanas foi equivalente a uma redução de cerca de 50% da ingestão de ração dos animais ADULTOS, ENVELHECIDOS e EXERCITADOS.

5.1.3 *Peso dos tecidos*

O peso dos tecidos e órgãos analisados foram corrigidos para 100 g de peso corporal do animal correspondente, diminuindo, assim, a influência da variação corporal existente entre os grupos estudados. Os valores absolutos estão ilustrados no APÊNDICE IV.

Quanto ao peso dos tecidos adiposos, estes se mostraram elevados nos animais ENVELHECIDOS quando comparados aos animais ADULTOS. Este aumento foi da ordem de 81% para o TAE, 2,2 vezes para o TARP e duas vezes para o TAME (FIGURA 9).

Na RC-4 estes depósitos sofreram uma redução equivalente a 43%, 57% e 57%, respectivamente no TAE, TARP e TAME quando comparados aos animais ENVELHECIDOS, como ilustrado na FIGURA 9.

Com a RC-6 estes tecidos sofreram uma acentuada redução quando comparados aos valores encontrados para os animais ENVELHECIDOS, sendo da ordem de 45%, 70% e 71% ,respectivamente (FIGURA 9). Quando comparados aos animais RC-4 houve apenas uma redução do peso relativo do TAM, da ordem de 53%, como ilustrado na FIGURA 9.

Nos animais EXERCITADOS houve apenas um pequeno decréscimo no peso dos TAS (quando estes foram comparados aos animais ENVELHECIDOS), sendo equivalentes a 40% para o TAE, 51% para o TARP e 46% para o TAME. Quanto ao TAM, este sofreu um aumento de peso da ordem de 65% e 2,8 vezes, respectivamente, quando comparado aos animais ENVELHECIDOS e RC-6 (FIGURA 9).

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

£ $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

& $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

FIGURA 9 - Peso relativo dos tecidos adiposos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO III.

Nos músculos avaliados foi encontrado um aumento de peso nos animais EX (35%) e RC-6 (60%) quando comparados aos animais AD, como ilustrado na TABELA 1.

No fígado encontramos uma redução de cerca de 21% nos animais EX quando comparados aos animais AD (TABELA 1), assim como uma redução no peso das glândulas adrenais dos animais ENV e EX quando comparados aos AD, ambos da ordem de 41%, ilustrado na TABELA 1.

Quanto ao timo, observou-se uma redução no peso do órgão nos animais ENV, RC-4, e EX da ordem de 41%, 51% e 50% (respectivamente) quando comparados aos animais AD, já o grupo RC-6 apresentou uma redução de 60% quando comparado aos animais ENV (TABELA 1).

5.1.4 *Quantidade de lípidos*

Nos animais submetidos à RC-4 e RC-6 (TABELA 2) houve uma redução no conteúdo lipídico do TAME, respectivamente da ordem de 19% e 25%.

Quanto ao TAM, houve uma redução no conteúdo lipídico apenas nos animais RC-4, em torno de 30% quando comparado aos animais ENV (TABELA 2).

No músculo gastrocnêmio (TABELA 3) ocorreu uma redução equivalente a 53% em comparação aos animais AD e 50%, em comparação aos ENV.

No fígado dos animais submetidos à RC-6 houve uma diminuição da quantidade de lípidos da ordem de 21%, quando comparados aos animais ENV e RC-4, respectivamente como ilustrado na TABELA 4. No grupo EX houve um acréscimo de 26% na quantidade de lípidos quando comparado ao grupo RC-6.

Na carcaça (TABELA 4) dos animais ENV houve um acentuado aumento de gordura, da ordem de 65% quando comparado aos animais AD.

TABELA 1 - Peso relativo dos tecidos e órgãos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n).

	AD		ENV		RC-4		RC-6		EX	
	Peso relativo (g de tecido / 100 g de peso corporal)									
SÓLEO	0,055 ± 0,004	(4)	0,074 ± 0,004	(10)	0,078 ± 0,002	(3)	0,088 ± 0,008	(6) *	0,061 ± 0,006	(4)
EDL	0,083 ± 0,005	(4)	0,081 ± 0,002	(10)	0,084 ± 0,001	(3)	0,087 ± 0,006	(6)	0,076 ± 0,006	(4)
GASTRO	1,176 ± 0,020	(4)	1,109 ± 0,049	(10)	1,034 ± 0,021	(3)	1,095 ± 0,031	(6)	1,036 ± 0,052	(4)
FÍGADO	2,96 ± 0,14	(8)	2,50 ± 0,07	(21)	2,68 ± 0,34	(6)	2,63 ± 0,07	(8)	2,35 ± 0,08	(8) *
ADRENAIS	0,017 ± 0,001	(8)	0,010 ± 0,001	(26) *	0,011 ± 0,001	(9)	0,014 ± 0,001	(11)	0,010 ± 0,003	(8) *
TIMO	0,105 ± 0,007	(12)	0,062 ± 0,004	(30) *	0,052 ± 0,005	(9) *	0,025 ± 0,004	(6) #	0,052 ± 0,006	(8) *
BAÇO	0,202 ± 0,011	(8)	0,196 ± 0,009	(20)	0,153 ± 0,008	(6)	0,208 ± 0,014	(7)	0,199 ± 0,013	(8)
CARCAÇA	87,6 ± 0,65	(9)	88,4 ± 0,59	(22)	91,3 ± 1,3	(6)	88,8 ± 0,24	(8)	83,3 ± 3,30	(8) £

SÓLEO = Músculo Solear; GASTRO = Músculo gastrocnêmio e EDL = Músculo extensor digitório longo.

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

£ p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

TABELA 2 - Quantidade de lípidos presente nos tecidos adiposos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n).

	TAE		TARP		TAME		TAM	
	Lípides (mg / g de tecido)							
AD	835,1 ± 14,8	(8)	831,7 ± 27,8	(8)	761,1 ± 16,3	(8)	492,0 ± 30,8	(7)
ENV	814,2 ± 12,8	(21)	803,6 ± 25,9	(22)	836,7 ± 24,6	(22)	596,3 ± 22,1	(21)
RC-4	757,9 ± 28,4	(6)	722,7 ± 45,5	(5)	678,6 ± 53,1	(5) [#]	419,4 ± 70,5	(6) [#]
RC-6	830,9 ± 12,8	(8)	806,0 ± 34,4	(8)	630,0 ± 39,1	(8) [#]	558,8 ± 46,6	(8)
EX	815,6 ± 7,2	(8)	811,7 ± 75,8	(8)	770,9 ± 41,2	(8)	552,8 ± 15,6	(8)

TAE = Tecido adiposo epididimal; TARP = Tecido adiposo retroperitoneal; TAME = Tecido adiposo mesentérico; TAM = Tecido adiposo marron.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

TABELA 3 - Quantidade de lípidos presente nos músculos: gastrocnêmio, solear e extensor digitório longo dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n).

	GASTRO		SÓLEO		EDL	
	Lípides (mg / g de tecido)					
AD	13,9 ± 2,3	(4)	21,8 ± 3,3	(4)	13,9 ± 1,1	(4)
ENV	12,9 ± 0,9	(10)	34,6 ± 3,8	(9)	13,9 ± 1,3	(10)
RC-4	11,9 ± 1,6	(3)	28,5 ± 8,7	(3)	17,9 ± 1,8	(3)
RC-6	12,4 ± 1,3	(6)	32,5 ± 8,9	(5)	11,5 ± 0,8	(5)
EX	6,5 ± 1,2	(4) ^{* #}	27,9 ± 5,3	(4)	10,2 ± 2,6	(4)

GASTRO = Músculo gastrocnêmio; SÓLEO = Músculo Solear; EDL = Músculo Extensor Digitório Longo

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

TABELA 4 - Quantidade de lípidos presente no fígado e carcaça dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípidos em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n).

	FÍGADO		CARÇAÇA	
	Lípides (mg / g de tecido)			
AD	32,3 ± 1,5	(7)	85,5 ± 11,0	(7)
ENV	34,5 ± 0,6	(21)	141,4 ± 10,1	(21) *
RC-4	34,3 ± 1,5	(6)	104,7 ± 25,7	(6) [#]
RC-6	27,1 ± 3,4	(6) ^{# £}	76,1 ± 10,0	(6) [#]
EX	34,1 ± 1,5	(8) ^{&}	89,4 ± 6,2	(8) ^{# £}

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

[£] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

Com os protocolos de emagrecimento houve uma redução da ordem de 26%, 46%, 37% respectivamente dos animais RC-4, RC-6 e EX quando comparados aos AD. No grupo EX houve também houve uma redução equivalente a 15% quando comparado aos animais RC-4.

5.1.5 *Quantidade de proteína*

No timo observou-se uma acentuada redução da quantidade de proteína nos animais ENV, RC-4, RC-6, EX quando comparados aos animais AD, respectivamente da ordem de 28%, 35%, 37% e 53% (TABELA 5). Quando comparados aos animais ENV (TABELA 5) o grupo EX mostrou uma redução da ordem de 35%.

Com relação ao baço (TABELA 5) houve um acréscimo na quantidade de proteínas dos animais RC-4, quando comparados aos AD (34%); e dos EX, comparados aos RC-6 (34%). Uma redução de 29% foi encontrada nos animais RC-6 quando comparados aos RC-4.

5.1.6 *Porcentagem de gordura corporal*

Os animais ENV mostraram um aumento da porcentagem de gordura equivalente a 84% quando comparados aos animais AD. Os protocolos de emagrecimento reduziram a porcentagem de gordura dos animais ENV aos valores de 35%, 51% e 43% (respectivamente RC-4, RC-6 e EX), como ilustrado na FIGURA 10.

As correlações obtidas entre a porcentagem de gordura e o peso dos tecidos TAE, TARP e TAME mostraram-se significativas e positivas segundo correlação de *Pearson*, na qual o valor de r equivale a 0,8771, 0,9448 e 0,8990, respectivamente (FIGURA 11). Em relação à quantidade de lípidos presentes na carcaça, a correlação também se mostrou significativa e linear, e o valor de r igual a 0,9799 (FIGURA 11).

TABELA 5 - Quantidade de proteína do timo e baço dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de lípides em mg / g de tecido $\pm$ EPM (n).

	TIMO		BAÇO	
	Quantidade de proteína (mg / g de tecido)			
AD	89,31 ± 4,06	(8)	45,78 ± 2,84	(8)
ENV	64,78 ± 5,11	(8) *	50,07 ± 2,07	(12)
RC-4	58,03 ± 9,01	(3) *	61,26 ± 4,69	(3) *
RC-6	56,47 ± 2,26	(6) *	43,67 ± 2,13	(7) [£]
EX	42,01 ± 4,93	(4) * [#]	58,63 ± 5,48	(4) ^{&}

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

^E p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

FIGURA 10 - Porcentagem de gordura dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO IV.

TAE = tecido adiposo epididimal; TARP = tecido adiposo retroperitoneal; TAME = tecido adiposo mesentárico e TAM = tecido adiposo marrom

Onde: r = coeficiente de Pearson e p = nível de significância.

* Correlação significante e positiva.

FIGURA 11 - Correlações lineares entre a porcentagem de gordura corporal e o peso total (g) dos tecidos adiposos (TAE, TARP, TAME e TAM) e quantidade de gordura presente na carcaça (mg / g de carcaça). Os dados correspondem aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), sendo r o valor encontrado na correlação de Pearson. Os dados estão apresentados no ANEXO V.

5.2 *Citrato sintase*

A atividade máxima da enzima citrato sintase foi dosada no músculo gastrocnêmio estando 4,3 vezes aumentada nos animais EX quando comparados aos ENV (FIGURA 12).

5.3 *Parâmetros séricos*

5.3.1 *Glicemia, Insulinemia e índice G/I*

Não foi encontrada diferença entre os níveis glicêmicos dos animais estudados (TABELA 6). Com relação à concentração de insulina, esta se mostrou reduzida nos animais EX quando comparados aos AD (redução de 51%) e ENV (49%), como ilustrado na TABELA 6.

O índice G/I mostrou uma tendência a elevação da ordem de 62% quando comparado aos animais AD e 70 % em relação ao ENV (TABELA 6).

5.3.2 *Cortisol e corticosterona*

Não foram observadas alterações significativas nas concentrações séricas de cortisol e corticosterona, como ilustrado na TABELA 7. Houve apenas uma tendência a elevação das concentrações de corticosterona dos animais ENV quando comparados aos AD (aumento de duas vezes, ilustrado na TABELA 7).

5.3.3 *Testosterona e GH*

Houve uma redução da concentração de testosterona nos animais ENV, RC-6 e EX, da ordem de 52%, 82% e 68%, quando comparados aos AD. Quando comparados aos animais ENV, houve uma tendência a

[#] $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

FIGURA 12 - Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio dos animais ENVELHECIDOS (ENV) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em nmol / minuto x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n), apresentados no ANEXO VI.

TABELA 6 - Concentração sérica de glicose, insulina e índice glicose/insulina dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n) da glicose em mg / dl e insulina μ U / ml de soro.

	GLICOSE		INSULINA		G / I	
	(mg / dl)		(μ U / ml)		(Índice)	
AD	99,89 $\pm$ 5,65	(8)	17,71 $\pm$ 2,49	(6)	6,60 $\pm$ 0,20	(6)
ENV	92,95 $\pm$ 1,51	(19)	17,00 $\pm$ 2,44	(13)	6,29 $\pm$ 0,63	(13)
RC-6	92,26 $\pm$ 2,12	(15)	16,84 $\pm$ 5,48	(7)	7,91 $\pm$ 2,25	(6)
EX	91,57 $\pm$ 1,31	(8)	8,73 $\pm$ 0,68	(6) * #	10,67 $\pm$ 0,80	(6)

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

TABELA 7 - Concentração sérica de corticosterona dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração em ng / ml de soro $\pm$ EPM (n).

	Corticosterona	
	(ng / ml de soro)	
AD	0,36 $\pm$ 0,09	(3)
ENV	0,77 $\pm$ 0,24	(3)
RC-6	0,43 $\pm$ 0,11	(3)
EX	0,26 $\pm$ 0,06	(3)

diminuição da concentração de testosterona nos animais RC-6 (em 62%) e EX (32%), como ilustrado na TABELA 8.

O GH mostrou-se reduzido em 44% apenas nos animais RC-6, quando comparados aos animais AD e ENV (TABELA 8)

5.3.4 *Glutamina e Albumina*

As concentrações de glutamina e albumina, ilustradas na TABELA 9, não se mostraram diferentes entre os grupos estudados.

5.3.5 *Interleucinas*

Não foi encontrada diferença entre as IL-1 avaliada nos grupos estudados (TABELA 10).

Com relação à IL-2, houve uma tendência à sua diminuição nos animais ENV quando comparados aos AD, da ordem de 22%, como ilustrado na TABELA 10. Nos animais RC-6 houve uma elevação dos valores encontrados para os animais ENV, equivalente a 30%, sendo que nos animais EX houve uma redução destas concentrações quando comparadas àquelas observadas para os animais AD (36%) e RC-6 (37%), como ilustrado na TABELA 10.

Nos animais RC-6 e EX houve uma tendência à redução dos valores encontrados para a IL-6 quando comparados aos animais AD (respectivamente 26% e 55%) e ENV (31% e 58%).

5.3.6 *Imunoglobulinas*

A IgA foi detectada apenas nos animais ENV e RC-6, como mostra a TABELA 11.

TABELA 8 - Concentração sérica de testosterona e Gh dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração $\pm$ EPM (n), respectivamente em ng/dl e ng/ml de soro.

	TESTOSTERONA		Gh	
	(ng / dl de soro)		(ng / ml de soro)	
AD	69,39 $\pm$ 14,26	(5)	1,74 $\pm$ 0,30	(5)
ENV	33,20 $\pm$ 7,23	(4) [*]	1,77 $\pm$ 0,19	(5)
RC-6	12,65 $\pm$ 4,36	(4) [*]	1,00 $\pm$ 0,10	(5) ^{*#}
EX	22,44 $\pm$ 5,47	(5) [*]	1,26 $\pm$ 0,11	(5)

^{*} p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

TABELA 9 - Concentração sérica de glutamina e albumina dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média da concentração $\pm$ EPM (n), respectivamente em nmol/ml e g/dl de soro.

	GLUTAMINA		ALBUMINA	
	(nmol / ml)		(g / dl)	
AD	1855,2 $\pm$ 29,5	(5)	1,93 $\pm$ 0,06	(10)
ENV	1827,5 $\pm$ 28,4	(7)	1,97 $\pm$ 0,09	(10)
RC-6	1865,0 $\pm$ 14,1	(7)	2,25 $\pm$ 0,05	(9)
EX	1778,1 $\pm$ 20,7	(7)	2,22 $\pm$ 0,20	(10)

TABELA 10 - Concentração sérica das interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 em animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em pg / ml de soro $\pm$ EPM (n).

	IL-1		IL-2		IL-6	
	(pg / ml)					
AD	17,54 ± 1,85	(5)	112,67 ± 37,69	(5)	115,14 ± 36,39	(5)
ENV	14,00 ± 0,84	(6)	87,70 ± 24,22	(5)	122,94 ± 37,10	(5)
RC-6	13,19 ± 0,86	(6)	114,40 ± 36,03	(5)	84,57 ± 20,66	(5)
EX	16,61 ± 2,26	(7)	72,38 ± 17,81	(7)	51,94 ± 12,53	(5)

TABELA 11 - Concentração sérica das imunoglobulinas IgA e IgG dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média em mg / ml de soro $\pm$ EPM (n).

	IgA		IgG	
	(mg / ml de soro)			
AD	ND	(6)	387,1 ± 7,4	(7)
ENV	22,2 ± 5,3	(8)	522,9 ± 121,9	(8)
RC-6	29,8 ± 5,2	(8)	424,4 ± 12,5	(8)
EX	ND	(4)	406,4 ± 11,0	(8)

ND = Não detectado.

Já a IgG se mostrou elevada em cerca de 35% nos animais ENV em relação aos AD, e os animais RC-6 e EX apresentaram uma redução da ordem de 20% quando comparados aos ENV (TABELA 11).

5.4 *Macrófagos*

5.4.1 *Capacidade fagocitária e produção de H_2O_2*

A capacidade fagocitária dos macrófagos nos animais ENV mostrou uma tendência de elevação da ordem de 76% quando comparados aos AD. Já nos animais RC-6, mostraram uma elevação em relação aos animais ENV equivalente a 2,4 vezes, sendo que nos EX este aumento foi significativo em comparação aos AD (sete vezes), EV (quatro vezes) e RC-6 (1,6 vezes), como nos mostra a FIGURA 13.

Quanto à produção de H_2O_2 houve apenas uma tendência à elevação nos macrófagos de animais RC-6 e EX quando comparados àqueles obtidos de animais AD (respectivamente, 44% e 53%) e ENV (28% e 36%), conforme ilustrado na FIGURA 13.

5.4.2 *Consumo e produção de substratos por macrófagos*

O consumo de glicose pelos macrófagos peritoneais não sofreu alteração em relação ao consumo de glicose e produção de lactato (TABELA 12). Já com relação ao consumo de glutamina, houve uma tendência a redução nos animais RC-6 em cerca de 40% quando comparado aos animais AD e ENV (TABELA 13). Nos animais AD e EX o consumo de glutamina priorizou a produção de aspartato, como ilustrado na TABELA 13; enquanto que nos animais ENV houve mais produção de glutamato e nos RC-6 praticamente não teve diferenças entre os dois substratos produzidos.

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

& $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

FIGURA 13 - Porcentagem de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n), respectivamente em % e nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹, apresentados no ANEXO VII.

TABELA 12 - Consumo de glicose e produção de lactato por macrófagos residentes da cavidade peritoneal incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO		PRODUÇÃO	
	Glicose		Lactato	
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)			
AD	11,70 ± 2,80	(6)	20,37 ± 3,66	(9)
ENV	9,59 ± 2,00	(10)	18,25 ± 6,32	(7)
RC-6	14,90 ± 9,40	(5)	16,73 ± 4,43	(8)
EX	7,45 ± 1,30	(6)	13,49 ± 4,35	(7)

TABELA 13 - Consumo de glutamina, produção de glutamato e aspartato por macrófagos residentes da cavidade peritoneal incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO		PRODUÇÃO		PRODUÇÃO	
	Glutamina		Glutamato		Aspartato	
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)					
AD	2,50 ± 0,77	(3)	4,94 ± 1,39	(7)	8,01 ± 4,00	(5)
ENV	2,47 ± 0,70	(9)	7,15 ± 2,13	(4)	1,66 ± 0,04	(3)
RC-6	1,46 ± 0,72	(4)	3,46 ± 0,79	(5)	2,92 ± 1,27	(4)
EX	3,19 ± 0,44	(5)	3,26 ± 0,71	(6)	7,21 ± 4,70	(6)

5.5 *Linfócitos*

5.5.1 *Proliferação de linfócitos*

O índice de proliferação dos linfócitos presentes no sangue mostrou uma tendência a elevação nos animais ENV e RC-6, quando comparados aos animais AD, após o estímulo com ConA (42% e 36% respectivamente) e LPS (58% e 49%), como mostra a FIGURA 14. Quanto aos animais EX, os linfócitos mostraram uma redução da capacidade proliferativa quando estimulados com ConA (16% em relação aos AD, 46% ENV e 44% RC-6) e LPS (62% ENV).

Nos linfócitos presentes no linfonodo mesentérico nota-se uma diminuição dos valores encontrados para os animais EX e estimulados na presença de ConA, da ordem de 22% em relação aos AD e 27%, EV, como mostra FIGURA 15.

5.5.2 *Consumo e produção de substratos por linfócitos*

O consumo de glicose pelos linfócitos do linfonodo mesentérico mostraram uma tendência a elevar-se nos animais ENV e RC-6 na proporção de 2,7 vezes e 8 vezes (respectivamente) quando comparados aos animais AD. Já o grupo EX manteve seus valores próximos aos animais AD (sofrendo uma redução de 47% em comparação aos animais ENV), como ilustrado na TABELA 14. Quanto ao lactato, este manteve o mesmo perfil descrito para a glicose (TABELA 14).

A glutamina não teve seu consumo alterado entre os grupos avaliados (TABELA 15) mas em contrapartida a produção de glutamato mostrou-se elevada nos animais ENV, quando comparados aos animais AD (3,7 vezes), sendo que nos animais EX as concentrações de glutamina sofreram uma redução de 71% em comparação aos ENV (TABELA 15).

[#] $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

[&] $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

FIGURA 14 - Índice de proliferação de linfócitos presentes no sangue dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO VIII.

FIGURA 15 - Índice de proliferação de linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n), apresentados no ANEXO IX.

TABELA 14 - Consumo de glicose e produção de lactato por linfócitos do linfonodo mesentérico incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO		PRODUÇÃO	
	Glicose		Lactato	
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)			
AD	4,22 ± 2,40	(3)	1,35 ± 0,30	(3)
ENV	11,57 ± 5,10	(7)	15,03 ± 4,68	(5)
RC-6	34,01 ± 8,70	(11)	12,92 ± 8,54	(9)
EX	6,10 ± 1,91	(6)	7,33 ± 1,56	(3)

TABELA 15 - Consumo de glutamina, produção de glutamato e aspartato por linfócitos do linfonodo mesentérico incubados por 1 hora, dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO Glutamina		PRODUÇÃO Glutamato		PRODUÇÃO Aspartato	
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)					
AD	2,75 ± 0,49	(5)	4,02 ± 0,63	(9)	2,35 ± 0,92	(5)
ENV	1,57 ± 0,10	(4)	14,80 ± 1,89	(3) [*]	10,83 ± 5,06	(3)
RC-6	4,43 ± 1,40	(4)	7,95 ± 2,58	(5)	5,43 ± 1,40	(3)
EX	2,22 ± 0,86	(3)	4,33 ± 0,34	(4) [#]	8,91 ± 0,02	(3)

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo natural caracterizado pela inadequação dos mecanismos homeostáticos, que leva a uma progressiva perda da capacidade de resposta aos mais diferentes tipos de desafios, como ocorre com o sistema imunológico. Os mecanismos envolvidos no envelhecimento e sua regulação ainda são alvo de muitos estudos, mas sem dúvida, envolvem diversos aspectos que levam às mudanças na composição corporal observada durante este processo. De fato, se considerarmos que o envelhecimento provoca aumento na massa de gordura e perda de massa magra, e ainda a relação do aumento de gordura com diversas patologias, fica evidente a relação entre os três elementos: envelhecimento, massa de gordura e a resposta imunológica.

Considerando-se as inúmeras dificuldades experimentais que o trabalho com humanos impõem, amplamente listadas na literatura (SHINKAI et alli, 1997), decidimos avaliar as inter-relações entre o envelhecimento, aumento de gordura, restrição calórica e exercício físico num modelo experimental. Para tanto, avaliamos inicialmente as alterações na composição corporal de ratos Wistar envelhecidos, assim como aquelas induzidas pelos protocolos de restrição calórica e exercício, duas importantes formas de se alterar a composição corporal de indivíduos envelhecidos.

6.1 *Envelhecimento e composição corporal*

O processo de envelhecimento leva a profundas alterações na composição corporal, como podemos observar pelo aumento de peso dos animais ENVELHECIDOS (ENV), com idade entre 15 a 18 meses, quando comparado aos animais ADULTOS (AD), com dois meses de idade. Isto provavelmente se deve ao aumento do peso dos tecidos adiposos epididimal (TAE), retroperitoneal (TARP) e mesentérico (TAME). Estes dados

estão de acordo com GOMMERS et alli, 1983 que mostram um aumento do peso corporal e também dos tecidos adiposos em ratos Wistar com 24 meses de idade. Além disto, estes autores mostram que há uma menor taxa de utilização de glicose por estas células durante a senescência reforçando a hipótese de que o aumento de gordura no envelhecimento está relacionado à resistência periférica à insulina (BARZILAI, BANERJEE, HAWKINS, CHEN, ROSSETI, 1998). Um aspecto que pode auxiliar na compreensão da maior resistência à insulina nos animais ENV quando comparados aos AD é o fato de que os adipócitos dos animais adultos possuem 4 a 5 vezes maior atividade metabólica, e portanto consomem maior quantidade de glicose.

Já é bem documentado na literatura, como nos mostra BARZILAI et alli (1998), que o envelhecimento está associado a um progressivo aumento das concentrações plasmáticas de glicose e insulina, assim como do tecido adiposo visceral, tanto para humanos como roedores. Em vista deste aspecto foi dosada a glicose e insulina sérica em jejum que não apresentaram alterações entre os grupos estudados. Provavelmente isto ocorreu devido ao prolongado tempo de jejum a que estes animais foram submetidos (em torno de 8 a 12 horas) mascarando um possível aumento da glicemia, já que grandes períodos em jejum podem alterar significativamente os níveis glicêmicos e insulinêmicos. Ainda na tentativa de encontrar um possível indicador da resistência à insulina *in vivo* calculou-se o índice glicose/insulina (G/I), como descrito em CARO (1991) e segundo o qual valor reduzido está relacionado à maior resistência à insulina. Mas não foi encontrada nenhuma diferença entre os animais AD e ENV, reforçando hipótese de que o tempo prolongado do jejum impediu a verificação da resistência a insulina.

Como não houve alteração entre o conteúdo de ração ingerida entre os ratos AD e ENV, o aumento da gordura corporal pode ter ocorrido também em função de uma série de fatores, como: diminuição da atividade física espontânea dos animais; diminuição da necessidade energética basal das células (COOGAN, 1999); diminuição da massa magra, principalmente

massa muscular (sarcopenia) que ocorre durante o processo de envelhecimento (BROSS, STORER & BHASIN, 1999).

A sarcopenia é um processo caracterizado pela perda de massa muscular estando profundamente relacionada ao processo de envelhecimento (DAW, STARNESS & WHITE, 1988; KATZEFF et alli, 1995). Esta perda muscular que ocorre principalmente nos tecidos musculares com predominância de fibra do tipo II (branca) (PROCTOR, BALAGOAL & NAIR, 1998) pode ser justificada em parte pela reduzida capacidade de reinervação destas fibras quando comparadas as do tipo I (vermelha), como mostrado por TSENG, MARSH, HAMILTONS & BOTH, 1995. Apesar destas observações, encontramos um aumento no peso do músculo solear, que é composto predominantemente por fibras do tipo I, segundo DELP & DUAN (1996). Isto pode ter ocorrido não pelo aumento de proteína muscular, mas sim pelo aumento de triglicérides intramusculares como podemos comprovar através do aumento na quantidade de lípides encontrado neste tecido (COOGAN, 1999). Outro fator a ser considerado quanto à indicação de proteólise é que a avaliação realizada não é sensível a ponto de detectar alterações sutis na concentração de proteína muscular, sendo necessárias outras técnicas como a dosagem da 3-metil-histidina para detectar uma possível proteólise induzida pelo envelhecimento e potencializada pela RC (KATZEFF et alli, 1995).

6.2 *Protocolos de emagrecimento*

Em nosso modelo experimental avaliamos o papel do aumento da massa de gordura na resposta imunológica de ratos envelhecidos, assim como a possível reversão destas alterações pelo emagrecimento, a partir de duas estratégias distintas, a restrição calórica e o exercício aeróbio.

É interessante notarmos que ambos os protocolos têm sido relacionados a melhorias na condição de vida de idosos. O papel

desenvolvido pelo sistema imunológico, nestes casos, ainda não está estabelecido, embora, em função dos resultados descritos para ambos os protocolos de emagrecimento (WEINDRUCH, 1996; VENKATRAMAN & FERNANDES, 1997) podemos inferir um importante papel de ambos na regulação do sistema imunológico. Desta forma, caracterizamos as alterações metabólicas e de composição corporal induzidas pela restrição calórica e exercício físico moderado sobre a composição corporal, indicadores nutricionais e sistema imunológico.

6.2.1 *Avaliação dos protocolos utilizados*

A primeira preocupação acerca da utilização da restrição calórica foi caracterizar possíveis alterações no estado nutricional dos animais, uma vez que a desnutrição pode afetar a resposta imune, levando ao aparecimento de quadros de imunossupressão. Para avaliar o "status" nutricional dos animais, principalmente os submetidos à restrição calórica por quatro e seis semanas, dosou-se a concentração sérica de albumina. Justamente por ser sintetizada pelo fígado, mudanças na concentração sérica podem ocorrer devido a uma grande redução na ingestão de proteína (BAUMGARTNER, KOEHLER, ROMERO & GARRY, 1996). Nos animais estudados não foi detectada nenhuma alteração na concentração de albumina sérica, provavelmente porque estes animais foram alimentados sempre com a quantidade ideal de proteína não só no envelhecimento, mas sim em todo o seu desenvolvimento (BAUMGARTNER et alii, 1996), e embora a RC tenha reduzido o aporte protéico, este não foi suficiente para levar a um quadro de desnutrição.

O exercício aeróbio quando praticado cronicamente promove diversas alterações fisiológicas, como: aumento no número e tamanho de mitocôndrias, aumento das enzimas oxidativas, aumento do glicogênio muscular, entre outras. Como forma de avaliar a efetividade do protocolo de

exercício em natação a que os animais envelhecidos foram submetidos foi medida a atividade máxima da enzima *Citrato Sintase* no músculo gastrocnêmio dos animais EX. Esta importante enzima do metabolismo oxidativo, responsável pela entrada de carbono e, portanto manutenção do fluxo pelo Ciclo de Krebs (NEWSHOLME & LEECH, 1989), aumentou em cerca de 4,3 vezes sua atividade nos animais EXERCITADOS (EX) quando comparados aos animais ENVELHECIDOS (ENV) mostrando que a intensidade e duração das sessões de natação utilizadas durante o treinamento dos animais, foram capazes de melhorar a condição aeróbia dos mesmos.

6.2.2 *Composição corporal*

A restrição calórica e o exercício aeróbio são práticas que sabidamente aumentam a mobilização lipídica, refletindo diretamente sobre a composição corporal. Os protocolos utilizados neste estudo mostraram-se eficientes na redução do peso corporal de animais envelhecidos atuando diretamente no peso corporal e peso dos tecidos adiposos TAE, TARP, TAME e TAM.

Apesar da redução ocorrida no peso corporal e tecidos adiposos, esta não ocorreu na mesma proporção entre os protocolos utilizados, sendo a RC-6 (restrição calórica oferecida por 6 semanas) a mais eficiente na diminuição dos tecidos TAE, TARP e TAME, seguida da RC-4 e EX. Isso mostra que a restrição calórica é mais eficiente na promoção da perda de peso e na diminuição da gordura corporal, mas que as respostas dos diferentes sítios é específica, pois estas não ocorreram na mesma proporção entre os tecidos avaliados.

Esta diferença quanto à redução dos tecidos adiposos pode ser justificada pela heterogeneidade na resposta lipolítica existente entre os mesmos (PETERSMARK, RODRÍGUEZ, MATOS & GONZÁLES, 1995). Podemos observar que o TAE, extensamente descrito na literatura como tecido adiposo

que melhor responde à lipólise estimulada pelas catecolaminas, *in vitro* (RODBELL, 1964; WAHRENBERG, LÖNNQVIST, HELLMÉR & ARNER, 1992), mostrou redução significativa nos grupos estudados, sendo mais acentuadas nos animais submetidos RC-4 e RC-6.

A grande maioria dos lípidos é armazenada como triglicérides no tecido adiposo na forma saturada, compostos principalmente pelos ácidos graxos palmítico e esteáricos. Com o estímulo promovido principalmente pelas catecolaminas (CALLES-ESCANDÓN & DRISCOLL, 1994) estes lípidos são degradados para o fornecimento de energia.

As diferentes respostas lipolíticas encontradas entre os tecidos adiposos podem justificar a redução na quantidade de lípidos do TAME dos animais submetidos à RC-4 e RC-6. Com isso, os lípidos que compõem este tecido podem estar comprometidos, pois segundo COMIZIO, PIETROBELLI, TAN, WANG, WITHERS, HEYMSFIELD & BOOZER (1998) a perda de peso de forma severa pode alterar a composição dos lípidos que compõem o tecido adiposo, podendo assim utilizar para o fornecimento de energia, além dos triglicérides, as gorduras essenciais, como os fosfolípidos constituintes de membrana.

Apenas com estes dados se torna impossível especular quanto ao tipo de gordura que foi utilizada como fonte energética, pois a análise de conteúdo lipídico utilizada não diferencia os tipos de lípidos presentes nos tecidos, para isso seria interessante submeter às amostras à análise em cromatógrafo para a quantificação e diferenciação dos lípidos presentes.

Comprovando a eficácia do protocolo de exercício aeróbio encontramos também uma redução da quantidade de gordura corporal dos animais exercitados (EX), já que este tipo de exercício é o recomendado para a diminuição da gordura corporal devido ao aumento da utilização de gordura como substrato durante o exercício (ACSM, 1994; HAWLEY, BROUNS & JEUKENDRUP, 1998; McARDLE et alii, 1998; POLLOCK & WILMORE, 1993; RANALLO & RHODES, 1998). As diferenças encontradas entre os protocolos

de RC-4, RC-6 e EX, principalmente a respeito do peso corporal, podem ser justificadas pelo efeito protetor, sobre a massa magra (massa muscular), obtido pelo treinamento moderado.

Avaliando-se a resistência insulínica pelo índice Glicose / Insulina (G/I) séricos, como descrito em CARO (1991), os animais EX mostraram uma tendência ao aumento deste índice, mostrando a otimização da captação da glicose independente da presença de insulina (já que esta se encontra reduzida). Este fato pode estar ocorrendo principalmente através do mecanismo de translocação dos transportadores de glicose do tipo quatro (GLUT 4), estimulados pela contração muscular e que facilita a captação de glicose independente da presença de insulina (ETGEN JUNIOR, JENSEN, WILSON, HUNT, CUSHMAN & IVY 1997).

Resumidamente, podemos observar através da porcentagem de gordura corporal que os animais ENVELHECIDOS possuem cerca de 2,3 vezes mais gordura que os ADULTOS; e que os protocolos de emagrecimento utilizados foram capazes de reduzir em cerca de 35%, 51% e 43% a quantidade de gordura dos animais submetidos à RC-4, RC-6 e EX, respectivamente. Como indicado nos trabalhos de PACHECO-SANCHEZ & GRUNEWALD, 1994 e KATZEFF et alli (1995) a RC-6 mostrou-se mais eficaz na indução da perda aguda de peso e gordura corporal, comparada à RC-4 e ao EX.

O TAM diferentemente dos tecidos adiposos comentados até o momento teve seu peso aumentado nos animais exercitados. Isto se deve ao fato deste tecido possuir características diferenciadas do tecido adiposo branco unilocular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999), sendo a calorigênese (formação de calor) a sua principal função (ARDÉVOL, ADÁN, REMESAR, FERNÁNDEZ-LÓPEZ & ALEMANY 1996). Este aumento de massa pode estar ligado à perda de calor propiciada pelo treinamento em água (apesar da temperatura da água manter-se a 31 °C) e com isso favorecer os processos envolvidos na calorigênese (ARDÉVOL et alli, 1996, FOSTER & FRYDMAN, 1979).

Estes dados se encontram em oposição à literatura já que LARUE-ACHAGIOTIS, RIETH, GOUBERN, LAURY & LOUI-SYLVESTERS (1995) mostram uma redução da capacidade termogênica do TAM induzida pelo exercício. Provavelmente outro fator que pode influenciar nossos resultados é o fato dos animais treinados permanecerem sozinhos na gaiola e com isso, potencializar a perda de calor principalmente nos momentos em que estes são retirados da água, já que por permanecer apenas um rato por gaiola diminui a chance de manutenção do calor corporal através do contato com outros animais.

O aumento da gordura corporal está intimamente ligado ao aumento dos tecidos TAE, TARP, TAM e da quantidade de gordura presente na carcaça destes animais, como podemos comprovar pelas correlações encontradas entre a porcentagem de gordura e estes sítios avaliados (FIGURA 11). Já em relação ao TAM não houve uma relação entre o peso e o aumento da gordura corporal, justamente devido à diferença na função exercida por este tecido quando comparados aos outros do tipo branco (TAE, TARP e TAME).

6.3 *Condições gerais dos grupos estudados*

Os dois protocolos utilizados neste estudo podem provocar, de maneira geral, uma resposta de estresse nos animais, uma vez que são capazes de alterar o equilíbrio do sistema neuroimunoendócrino. Para nos certificarmos de que ao fim do período experimental não havia interferência do estresse sobre os animais, avaliamos o peso das adrenais e a concentração sérica de hormônios relacionados ao estresse.

Como primeira avaliação do estresse a que estes animais foram submetidos determinou-se o peso das glândulas adrenais, parâmetro no qual não encontramos alterações significativas que possam justificar uma

liberação maior de catecolaminas. Isto nos indica que as alterações encontradas não podem ser justificadas pelo aumento do estresse.

A corticosterona é um importante hormônio contrarregulatório que pode ter atuação não somente no metabolismo de carboidratos, mas também em algumas funções do sistema imunológico (PEDERSEN & BRUUNSGAARD, 1995), sendo considerado também um indicador de estresse crônico. Em nosso estudo não encontramos alterações entre os grupos avaliados. Estes valores para os animais ENVELHECIDOS se encontram de acordo com a literatura (KENNEY, 1989), o mesmo não ocorrendo com aqueles observados no grupo RC, para o qual LEAKEY, CHEN, MANJGALADZE, TURTURRO, DUFFY, PIPKIN & HART (1994) mostram um aumento justificado pela necessidade de disponibilizar glicose para os tecidos essenciais. FERRANDEZ & DE LA FUENTE (1999) mostram também um aumento das concentrações de corticosterona em camundongos envelhecidos submetidos ao treinamento em natação. Provavelmente porque em suas análises estes autores sacrificam seus ratos após um curto período de treinamento, quando sabidamente não houve tempo para uma adaptação.

Com o envelhecimento encontramos também alterações na concentração do hormônio de crescimento (GH) e da testosterona, como ocorreu no nosso estudo. Baixas concentrações de testosterona se devem às mudanças ocorridas no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (BHASIN & BREMNER, 1997), onde há um destaque para a diminuição da resposta testicular a gonadodotrofinas.

O hormônio de crescimento (GH) também tem sua concentração reduzida em idosos, tanto na secreção em 24 horas, quanto na resposta ao exercício e ao hormônio liberador de GH (GHRh) (CARPAS, HARMAN & BLACKMAN, 1993). No nosso estudo não encontramos alterações nas concentrações de GH entre os animais ENVELHECIDOS e ADULTOS, provavelmente isto se deve a grande variação existente entre os animais do próprio grupo. Devemos lembrar que, para evitar variações circadianas,

todos os animais foram sacrificados no mesmo período, desta forma a concentração dos hormônios pode ser comparada adequadamente. Em contrapartida, houve uma redução de GH nos animais submetidos à RC-6 podendo estar relacionada à diminuição da massa muscular que possivelmente ocorre nestes animais.

6.4 *Alterações promovidas no sistema imunológico*

Durante o envelhecimento são descritos inúmeras alterações na resposta imunológica de humanos, camundongos e ratos (PAWELEC et alli, 1999; SHINKAI et alli, 1996; VENKATRAMAN & FERNANDES, 1997; WICK et alli, 2000). Estes achados levaram diversos autores a postular a existência de um quadro de imunosenescência, conforme cita SHINKAI et alli (1997), que seria um estado de desequilíbrio da resposta, uma vez que algumas funções imunológicas se encontram diminuídas e outras aumentadas, como a concentração plasmática de imunoglobulinas (BUCLEY III, BUCLEY & DORSEY, 1974; HALLGREN, BUCKLEY, GILBERSTEIN & YUNIS, 1973; PAGANELLI, QUINTI, FAGIOLO, COSSARIZZA, ORTOLANI, GUERRA, SANSONI, PUCILLO, SCALA, COZZI, BERTOLLO, MONTI & FRANCESCHI, 1992).

As alterações mais marcantes observadas na resposta imunológica de indivíduos centenários ou mesmo envelhecidos vão desde a involução tímica, passando pelas alterações na distribuição de diferentes clones de linfócitos T (CD45RO+, células de memória que estão aumentadas e CD45RA+, células não estimuladas, que diminuem), e liberação de citocinas, como a interleucina-2, cuja produção diminuída desvia o equilíbrio entre os diferentes tipos de linfócitos T *helper* para Th2, levando para uma maior produção de células de memória de baixa responsividade. Além disso, também ocorrem alterações significativas em macrófagos, com modificação da capacidade fagocitária e da produção de substâncias reativas derivadas

do oxigênio, não tendo sido descrita alteração na apresentação de antígenos.

Macrófagos e linfócitos além de apresentarem um papel chave na resposta imunológica apresentam uma relação metabolismo/função já estabelecida e uma característica metabólica comum, o consumo de altas taxas de glicose e glutamina (NEWSHOLME, NEWSHOLME, CURI, CRABTREE & ARDAWI, 1989; NEWSHOLME & LEECH, 1989). Nestas células a glicose é utilizada como importante precursor para síntese de lipídeos e proteínas, assim como pode levar à síntese de purinas e pirimidinas para produção de RNA e DNA. De fato, uma parcela muito pequena da glicose convertida é metabolizada pelo ciclo de Krebs. O principal substrato energético para macrófagos e linfócitos é a glutamina, que entra na porção esquerda do Ciclo de Krebs, podendo fornecer, quando oxidada, até 12 mols de ATP por mol de substrato descarboxilado. O esquema deste metabolismo particular está apresentado na FIGURA 16, adaptada de CURI, 1993. Desta forma, considerando-se a importância do metabolismo de glicose e glutamina para a funcionalidade destas células, avaliamos a resposta funcional e metabólica de macrófagos e linfócitos.

6.4.1 Macrófagos

Quanto aos macrófagos, o envelhecimento é capaz de levar a inúmeras alterações que, como mostrado na literatura, podem ser conflitantes (FERRANDEZ & DE LA FUENTE, 1999).

Avaliando a capacidade funcional de macrófagos, encontramos um aumento da função fagocitária entre os animais estudados, sendo que nos animais EX encontramos os maiores índices, seguidos da RC-6, RC-4 e ENV. Isso pode indicar tanto um aumento da função macrofágica, bem como a previa estimulação destas células por patógenos oportunistas, já que com o envelhecimento há uma maior probabilidade deste fato ocorrer.

FIGURA 16 - Representação esquemática de dois compartimentos metabólicos nos macrófagos e linfócitos de ratos: a) energético e b) biossintético.

Estes dados estão de acordo com COSTA ROSA et alli (1993) e FERRANDEZ & DE LA FUENTE (1999) que mostraram haver no envelhecimento um aumento da capacidade fagocitária.

Ainda quanto à capacidade funcional de macrófagos, com relação à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), COSTA ROSA et alli, 1993, mostram uma diminuição na sua produção, sob o estímulo do acetato de forbol-miristato (PMA), enquanto que FERRANDEZ & DE LA FUENTE, 1999, demonstram o oposto, quando as células foram incubadas na presença de látex. Nos resultados obtidos, observamos um aumento da produção de peróxido de hidrogênio nos animais submetidos à RC-6 e EX, reforçando o aumento da capacidade funcional, que também pode ser justificada pelo aumento da atividade lisossomal encontrada nos macrófagos dos animais envelhecidos (ORTEGA, COLLAZOS, BARRIGA & DE LA FUENTE, 1993).

Provavelmente estes dados conflitantes se devem à diversidade de experimentos realizados até o momento na literatura, que utilizam estímulos que provocam respostas diferenciadas nos macrófagos. Além disto, acredita-se que em diferentes períodos do envelhecimento encontramos respostas diferenciadas nos macrófagos, provavelmente dependente do grau de comprometimento das outras células do sistema imunológico (FERRANDEZ & DE LA FUENTE, 1999). Nossos dados se encontram de acordo com as observações de que não ocorrem alterações na apresentação de antígenos durante o envelhecimento, e demonstram que o treinamento e a RC não foram capazes de alterar as fases iniciais deste processo, que compreende internalização e destruição do material por parte de fagócitos (macrófagos, células dendríticas, entre outras).

Estas alterações funcionais observadas em macrófagos encontram-se pareadas as modificações em diversos aspectos do metabolismo de glicose e glutamina. A atividade máxima das enzimas *Hexoquinase*, *Glicose 6 fosfato desidrogenase*, *Citrato sintase* e *Glutaminase*

mostra-se diminuída nos macrófagos de ratos Wistar com 12 meses de idade (COSTA ROSA et alli, 1993).

Em nosso modelo avaliamos o papel do envelhecimento, da RC e do treinamento moderado sobre o consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato. Podemos observar que macrófagos de ratos envelhecidos convertem, assim como aqueles de ratos adultos, cerca de 90% da glicose consumida para lactato. O restante entra, em quantidades pequenas, no ciclo de Krebs ou é desviado para a síntese de macromoléculas lipídicas e protéicas. O treinamento não afeta este perfil, mas a RC reduz este desvio para 56%, sugerindo maior capacidade sintética nas células obtidas de ratos submetidos a este protocolo. Considerando-se que macrófagos são células de alta capacidade secretora, esta pode estar ainda mais aumentada sob estas circunstâncias. O significado de um aumento ou modificação do padrão secretório pelos macrófagos no desenrolar da resposta imunológica em ratos envelhecidos precisa ser melhor avaliado.

6.4.2 Linfócitos

O estudo dos órgãos linfóides, baço e timo, pode ser um indicativo da funcionalidade de algumas células do sistema imunológico, principalmente as linfocitárias. Dessa forma numa primeira etapa deste estudo determinamos o peso e conteúdo protéico do timo e baço dos animais estudados.

No envelhecimento, o timo, órgão responsável pela maturação dos linfócitos T (ABBAS et alli, 2000) sofre profundas alterações morfológicas (GLOBERSON, 1995; HOBBS & ERNST, 1997, YU et alli, 1997; MILLER, 1984) como as encontradas neste estudo, com a diminuição no seu peso, bem como do seu conteúdo protéico, que foram acentuadas com o emagrecimento promovido pela RC-4, RC-6 e EX.

Estas alterações podem ser justificadas pela diminuição da gordura presente no órgão, já que a proporção de gordura no Timo aumenta com o envelhecimento (BERTHO, DEMARQUAY, MOULIAN, VAN DER MEEREN, BERRIHAKNIN & GOURMELON, 1997). Com relação ao conteúdo protéico, a diminuição acentuada indica comprometimento da funcionalidade deste órgão, contribuindo para as alterações descritas para células T durante o envelhecimento (SHINKAI et alli, 1997, VENKATRAMAN & FERNANDES, 1997).

Nos últimos anos, grandes foram os avanços nos estudos relacionados ao quadro de imunossupressão que acompanha o processo de envelhecimento (ALMEIDA, 1994; FERRANDEZ & DE LA FUENTE, 1999; HIROKAWA, 1997; MAKINODAN & KAY, 1980; PAHLAVANI et alli, 1995; PAWELEC et alli, 1999; SPENCE, 1995), principalmente no que se refere ao estudo dos Linfócitos T, células responsáveis pela 2ª linha de defesa, e que tem seu metabolismo alterado principalmente devido à involução tímica (órgão responsável pela maturação e diferenciação das células T).

Como forma de se estimar a atividade das células imunológicas presentes na circulação foi quantificada a concentração sérica de citocinas nos animais estudados, as citocinas possuem diversas funções, como podemos observar no QUADRO 7, adaptado de PLAYFAIR 1997.

No nosso estudo, Interleucina 1 (IL-1) produzida principalmente por macrófagos ativados não mostrou valores diferenciados entre os quatro grupos avaliados. Já a IL-2, produzida pelos linfócitos T "helper" (Th1) mostrou uma tendência a diminuir nos animais ENV, que não foi corrigida pelo treinamento, em desacordo com os achados descritos por VENKATRAMAN & FERNANDES (1997) e SHINKAI et alli (1997). Esta queda na produção de IL-2 por animais envelhecidos seria, então, responsável pelo desvio da relação Th1/Th2 para uma maior participação das Th2, conforme descrito anteriormente. Neste aspecto a RC foi capaz de restaurar o equilíbrio entre estas populações, permitindo-nos sugerir que este seja fator importante para a manutenção de resposta imunológica adequada e aumento da

expectativa média de vida em animais submetidos à RC desde o desmame. A concentração sérica de IL-6 não se apresentou alterada, reforçando a idéia de uma prevalência de células Th2 nestes animais. Nenhuma das formas de intervenção modificou este parâmetro.

QUADRO 7 – Origem e principais funções de algumas citocinas.

Citocina	Célula de origem	Célula alvo	Funções
IL-1	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Macrófagos ➤ Células epiteliais 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Linfócitos T ➤ Macrófagos 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ativação
IL-2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Linfócitos Th1 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Linfócitos ativados: T e B 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Promove a proliferação celular
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Células apresentadoras de antígeno ➤ Linfócitos Th2 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Linfócitos T ➤ Linfócitos B ativados 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ativa linfócitos T ➤ Promove a maturação dos linfócitos B para produção de IgG

Outra função imunológica avaliada foi a proliferação de linfócitos em resposta aos mitógenos ConA e LPS. Na literatura existem dados divergentes com relação a este parâmetro, uma vez que este se modifica ao longo do envelhecimento. Nossos dados indicam um efeito maior do envelhecimento sobre as células T, e menor sobre as células B. Embora não tenham sido significativos, podemos especular que o exercício apresenta capacidade de comprometer ainda mais a proliferação de células T. Isto pode ser explicado pela maior prevalência de clones CD45RO⁺ (células de memória) de baixa responsividade, que estariam respondendo menos ao desafio antigênico, embora estes dados precisem ser confirmados.

As células B, cujas demais funções acredita-se estarem preservadas durante o envelhecimento não apresentaram alterações na resposta proliferativa ao LPS nos grupos avaliados. Já em relação as imunoglobulinas, produzidas pelos linfócitos B, pudemos observar que, de acordo com os achados de diversos outros pesquisadores (BUCLEY III et alli, 1974; HALLGREN et alli, 1973; PAGANELLI et alli, 1992) encontramos maior concentração sérica de IgA e IgG com o envelhecimento. No caso da IgA a RC não alterou sua concentração, o mesmo não tendo acontecido com o exercício, que devido a sua baixa concentração não foi detectada, assim como para os animais adultos. De fato, para as IgGs também pudemos observar que o exercício físico diminuiu suas concentrações a valores equivalentes àqueles encontrados para ratos AD.

Estes resultados funcionais apresentam-se associados a mudanças no consumo de glicose e sua destinação, no qual infócitos de ratos envelhecidos desviaram 65% de glicose para lactato, 100% mais que as células de ratos adultos, sugerindo uma menor disponibilidade do substrato para os processos de síntese, essencias para a proliferação celular. A RC, por sua vez, reduziu este desvio para 20%, sugerindo maior eficiência sintética. Estes dados, no entanto, precisam ser confirmados pela análise do fluxo de glicose pelo ciclo de Krebs (descarboxilação), que pode se constituir em um escape significativo, comprometendo os efeitos listados acima. O exercício levou os linfócitos a direcionarem, à semelhança do observado para células de ratos envelhecidos, 60% da glicose para lactato, sugerindo comprometimento da funcionalidade destas células. Considerando-se os resultados obtidos no ensaio de proliferação celular, parece-nos que as células T seriam as principais células envolvidas nestas alterações.

Dessa forma estes dados indicam, portanto, que a RC e o exercício físico influenciam a resposta imunológica de ratos envelhecidos, atuando, no entanto, sobre aspectos distintos da sua resposta.

7 CONCLUSÕES

- Com o envelhecimento há um aumento da massa de gordura em ratos Wistar, machos, com idade entre 15 a 18 meses;
- As Restrições calóricas por 4 e 6 semanas a 50% foram mais eficientes na indução de mudanças na massa de gordura quando comparada ao exercício;
- O protocolo de treinamento utilizado mostrou-se eficiente em reverter o ganho de massa de gordura e preservar a massa magra dos ratos estudados; enquanto que a RC só reverteu as alterações na quantidade de gordura, embora avaliações mais precisas precisem ser utilizadas para melhor caracterizar as alterações na massa magra;
- Houve aumento da capacidade funcional e metabólica nos macrófagos dos animais submetidos à RC-6 e principalmente ao EX;
- Observamos uma tendência ao desvio da relação Th1/Th2 no envelhecimento, com predomínio das células Th2, que foi parcialmente revertidos pela RC, mas mantida pelo exercício;
- As alterações funcionais observadas nos macrófagos e linfócitos independeram de alterações na concentração plasmática de glutamina;
- Linfócitos e macrófagos de ratos envelhecidos apresentaram alterações funcionais relacionadas ao metabolismo de glicose e glutamina;
- A perda de massa de gordura pela RC mostrou-se mais eficiente que o exercício em recuperar algumas funções linfocitárias, alteradas pelo envelhecimento;
- A perda de massa de gordura pelo EX mostrou-se mais eficiente que a RC em aumentar algumas funções dos macrófagos, em ratos envelhecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. ; POBER, J.S. Imunologia celular & molecular. 3.ed. Rio de Janeiro, Revinter, 2000.
- ABUMRAD, N.A.; PARK, J.H. ; PARK, C.R. Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of membrane protein. Journal of Biological Chemistry, v.259, n.14, p.8945-53, 1984.
- ABUMRAD, N.A.; PERKINS, R.C.; PARK, J.H. ; PARK, C.R. Mechanisms of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. Journal of Biological Chemistry, v.256, n.17, p.9183-91, 1981.
- ACSM - AMERICAN COLLEGE OF SPORTS AND MEDICINE. Prova de esforço e prescrição de exercício. Rio de Janeiro, Revinter, 1994.
- AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of white adipose tissue. In: BRAY, G.A.; BOUCHARD, C.; JAMES, W.P.T., eds. Handbook of obesity. New York, Marcel Dekker, Inc, 1997. p.359-78.]
- ALMEIDA, A.F. Alterações do metabolismo de glutamina com o envelhecimento: estudo em órgãos linfóides e linfócitos isolados. São Paulo, 1994. 64p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- ALP, P.R., NEWSHOLME, E.A. ; ZAMMIT, V.A. Activities of cintrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. Biochemical Journal, v.154, p.689-700, 1976.
- ARDAWI, M.S.M. ; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. Biochemical Journal, v.212, p.835-42, 1983.
- ARDÉVOL, A.; ADÁN, C.; REMESAR, X.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. ; ALEMANY, M. Brown adipose tissue temperature in lean and obese rats during exercise. International Journal of Obesity, v.20, p.733-7, 1996.

- ASPINES, L.E.; LEE, C.M.; WEINDRUCH, R.; CHUNG, S.S.; ROECKER, E.B. ; AIKEN, J.M. Caloric restriction reduces fiber loss and mitochondrial abnormalities in aged rat muscle. Federation of American Societies for Experimental Biology v.11, p. 573-81, 1997.
- AUGER, M.J. ; ROSS, J.A. The biology of the macrophage. In: LEWIS, C.E. ; McGEE, J. O'D. , eds. The natural immune system: the macrophage. Oxford, IRL Press, 1992. p.1-74.
- AZAIN, M.J.; HAUSMAN, D.B.; KASSER, T.R. ; MARTIN, R.J. Effect of somatotropin and feed restriction on body composition and adipose metabolism in obese Zucker rats. American Journal of Physiology, v.269, p.E137-44, 1995.
- BAILEY, J.W.; BARKER, R.L.; BEAUCHENE, R.E. Age-related changes in rat adipose tissue cellularity are altered by dietary restriction and exercise. Journal of Nutrition, v. 123, p.52-8, 1993.
- BARZILAI, N.; BANERJEE, S.; HAWKINS, M.; CHEN, W. ; ROSSETI, L. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. Journal of Clinical Investigation, v. 101, p. 1353-61, 1998.
- BAUMGARTNER, R.N.; KOEHLER, K.M.; ROMERO, L.; GARRY, P.J. Serum albumin is associated with skeletal muscle in elderly men and women. American Journal of Clinical Nutrition, v.64, p.552-8, 1996.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; MÖLERING, H. ; PFLEIDER, G. L-aspartate and L-asparagine. In: BERGMEYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. London, Academic Press, 1974.
- BERNARDIS, L.L. ; PATTERSON, B.D. Correlation between *Lee Index* and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. Journal of Endocrinology, v.40, p.527-8, 1968.
- BERNT, E.; BERGMEYER, H.U. L-glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD. In: BERGMEYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. London, Academic Press, 1974.

- BERTHO, J.M.; DEMARQUAY, C.; MOULIAN, N.; VAN DER MEEREN, A.; BERRIH-AKNIN, S. ; GOURMELON, P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for na active thymus during adult life. Cellular Immunology, v. 170, p.30-40, 1997.
- BHASIN, S.; BREMNER, W.J. Emerging issues in androgen replacement therapy. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.82, p.3-8, 1997.
- BRADLEY, J.; FRACP; FRCPA ; XU,X. Diet, age and immune system. Nutrition Reviews, v.54, n.11, p. S43-S50, 1996.
- BRAUER, R.W.; PESSOTI, R.L. The removal of bromosulphthalein from blood plasma by liver of the rat. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.97, p.358-70, 1949.
- BRAY, G.A.; BOUCHARD, C.; JAMES, W.P.T., eds. Handbook of obesity. New York, Marcel Dekker, 1997.
- BRINES, R.; HOFFMAN-GOETZ, L.; PEDERSEN, B.K. Can you exercise to make your immune system fitter? Immunology Today, v.17, p.252-4, 1996.
- BROSS, R.; STORER, T.; BHASIN, S. Aging and muscle loss. Trends in endocrinology & metabolism, v.10, n.5, p.194-8, 2000.
- BROWNLOW, B.S.; PARK, C.R.; SCHWARTZ, R.S. ; WOODS, S.C. Effect of meal pattern during food restriction on body weight loss and recovery after refeeding. Physiology & Behavior, v. 53, n. 3, p. 421-4, 1993.
- BUCKEY III, C.E.; BUCLEY, E.G.; DORSEY, F.C. Longitudinal changes in serum immunoglobulin levels in older humans. Feedings Proceedings, v.33, p.2036-9, 1974.
- BURNET, F.M. An immunological approach to ageing. Lancet, n.2, p.358-60, 1970.
- CALDER, P.C.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; CURI, R. Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. Life Sciences, v.56, n.6, p.455-63, 1995.
- CALLES-ESCANDÓN, J.; DRISCOLL, P. Free fatty acid metabolism in aerobically fit individuals. Journal of Applied Physiology, v.77, n.5, p.2374-9, 1994.

- CARO, J.F. Insulin resistance in obese and nonobese man. Journal of Endocrinology and Metabolism, v.73, n.4, 1991.
- CARPAS, R.; HARMAN, S.M.; BLACKMAN, M.R. Human growth hormone and human aging. Endocrinology Reviews, v.14, p.20-39, 1993.
- CHEN, R.F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. Journal of Biological Chemistry, v.242, p.173-81, 1967.
- COMIZIO, R.; PIETROBELLI, A.; TAN, Y.X.; WANG, Z.; WITHERS, R.T.; HEYMSFIELD, S.B. ; BOOZER, C.N. Total body lipid and triglyceride response to energy deficit: relevance to body composition models. American Journal of Physiology, v. 274, n. 37, p.E860-6, 1998.
- COGGAN, A.R. Effects of gender and aging on substrate metabolism during exercise in humans. In: LAMB, D.R.; MURRAY, R., ed. Perspectives in exercise science and sports medicine. Carmel, Cooper Publishing Group, 1999. v.12, p.355-87.
- COSTA ROSA, L.F.B.P.; ALMEIDA, A.F.; SAFI, D.A. ; CURI, R. Metabolic and functional changes in lymphocytes and macrophages as induced by ageing. Physiology & Behavior, v.53, p.651-6, 1993.
- CRISTÓFALO, V.J.; PHILLIPS, P.D.; SORGER, T. ; GERHARD, G. The regulation of cell senescence. In: WANG, E.; WARNER, H.R., eds. Growth control during cell aging. Boca Raton, CRC Press, 1985.
- CURI, R. Metabolismo do linfócito e sua regulação. São Paulo, 1993. 126p. Tese (Livre-docência) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- _____. Glutamina: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro, Sprint, 2000.
- DAW, C.K.; STARNESS, J.W. ; WHITE, T.P. Muscle atrophy and hypoplasia with aging: impact of training and food restriction. Journal of Applied Physiology, v.64, n.6, p.2428-32, 1988.

- DELP, M.D. & DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. Journal of Applied Physiology, v.60, n.1, p.261-70, 1996.
- DICE, J.F. Cellular and molecular mechanisms of aging. Physiological Reviews, n.73, p.149-59, 1993.
- ENGLE, P.C. ; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hidrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. Analytical Biochemistry, v.88, p.475-84, 1978.
- ETGEN JUNIOR, G.J.; JENSEN, J.; WILSON, C.M.; HUNT, D.G.; CUSHMAN, S.W. ; IVY, J.L. Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced recruitment of GLUT-4 to the cell surface. American Journal of Physiology, v.272, n.35, p.E864-9, 1997.
- EVANS, W.J. Exercise, nutrition and aging. Journal of Nutrition, n.122, p. 796-801, 1992.
- FAIN, J.N.; GARCIA-SAINZ, J.A. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. Journal of Lipid Research, v.24, p.945-66, 1983.
- FERRANDEZ M.D. ; DE LA FUENTE, M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. Acta Physiologica Scandinavica, v.166, p. 47-53, 1999.
- FIELDING, R.A. ; EVANS, W.J. Aging and the acute phase response to exercise: implications for the role of systemic factors on skeletal muscle protein turnover. International Journal of Sports Medicine, n.18, p.S22-7, 1997. Supplement.
- FOLCH, J.; LEES, M. ; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry, v. 226, p. 497-509, 1957.

- FOSTER, D.O. ; FRYDMAN, M.L. Tissue distribution of cold-induced thermogenesis in conscious warm- or cold-acclimated rats re-evaluated from changes in tissue blood flow: the dominant role brown tissue in replacement of shivering by nonshivering thermogenesis. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, v.57, p.257-70, 1979.
- FURTH, R. ; VAN AND SLUITER, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. Journal of Experimental Medicine, v.163, p.474-9, 1986.
- GARTNER, L.P. ; HIATT, J.L. Atlas de Histologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993.
- GLATZ, J.F.C. ; VAN DER VUSSE, G.J. Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. Molecular and Cellular Biochemistry, v.98, p.237-51, 1990.
- GLOBERSON, A. T lymphocytes and aging. International Archives of Allergy and Applied Immunology, v.107, p.491-7, 1995.
- GOLDSTEIN, S. Senescence. In: DeGROOT, L.J. et alli eds. Endocrinology. New York, Stratton, 1989. p.2001-25.
- GOMMERS, A.; DEHEZ-DELHAYE, M. ; CAUCHETEUX, D. Morphological and metabolic alterations in adipose tissue of very old rats. Journal of Gerontology, v.38, n.6, p.666-72, 1983.
- HALLGREN, H.M.; BUCKLEY III, C.E.; GILBERSTEIN, V.A.; YUNIS, E.J. Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and autoantibodies in aging humans. Journal of Immunology, v.111, p.1101-1107, 1973.
- HARGREAVES, M., ed. Exercise metabolism. Champaign, Human Kinetics, 1995.
- HARLEY, C.B.; FUTCHER, A.B. ; GREINER, C.W. telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature, n.345, p.458-60, 1990.
- HARMAN, D. Free radicals in aging. Molecular and Cellular Biochemistry, v.84, p.155-61, 1988.

- HARMAN,D. Role of free radicals in aging and disease. Annals of the New York Academy of Sciences, v.673, p.126-41, 1992.
- HARPER, M.; MONEMDJOU, S.; RAMSEY, J.J. ; WEINDRUCH, R. Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. American Journal of Physiology, v.275, n. 38, p.E197-206, 1998.
- HAUNER, H.; ENTENMAMM, G.; WABITSCH, M.; GAILLARD, D.; AILHAUD, G.; NÈGREL, R.; PFEIFFER, E. Promting effect of glucocorticoids on the differentiation on human adipocytes precursor cells cultured in achemical defined serum. Jornal of Clinical Investigation, v.84, p.1663-70, 1989.
- HAWLEY, J.A.; BROUNS, F. ; JEUKENDRUP, A. Strategies to enhance fat utilisation during exercise. Spots Medicine, v.25, v.4, p.241-57, 1998.
- HIROKAWA, K. Reversing and restoring immune functions. Mechanisms of Ageing and Development, v.93, p.119-24, 1997.
- HIROKAWA, K.; UTSUYAMA, M.; KASAI, M. ; KURASHIMA, C. Aging and immunity. Acta Pathologica Japonica, n.42, p. 537-48, 1992.
- HIROKAWA, K.; UTSUYAMA, M.; KASAI, M.; KURASHIMA, C.; ISHIJIMA, S. ; ZENG, Y. Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. Immunology Letters, v.40, p. 269-77, 1994.
- HIRSCH, J.;BATCHELOR, B. Adipose tissue cellularity in human obesity. Clinical and Endocrinology Metabolism, v.5, p.299-311, 1976.
- HISHINUMA, K.; NISHIMURA, T.; KONNO, A., HASHIMOTO, Y. ; KIMURA, S. The effect of dietary restriction on mouse T cell functions. Immunology Letters, v. 17, p. 351-6, 1988.
- HOBBS, M.V.; ERNST, D. T cell differentiation and cytokine expression in late life. Developmental and Comparative Immunology, v.21, n.6, p.461-70, 1997.
- HOLLOSZY, J.O. Exercise and food restriction in rats. Journal of Nutrition, v. 122, p. 774-7, 1992.

- HOPP, J.F.; PALMER, W.K. Electrical stimulation alters fatty acid metabolism in isolated skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.68, n.6, p.2473-81, 1990.
- IMAHORI, K. How I understand aging. Nutrition Reviews, n.50, p.351-2, 1992.
- JUNQUEIRA, L.C. ; CARNEIRO, J. Histologia básica. 9. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999.
- KATZEFF, H.L.; OJAMAA, K.M. ; KLEIN, I. The effects of long-term aerobic exercise and energy restriction on protein synthesis. Metabolism, v.44, n.2, p.188-92, 1995.
- KENNEY, R.A. Physiology of aging: a synopsis. London, Year Book Medical Publishers, 1989.
- KIM, M.; AIKEN, J.M.; HAVIGHURST, T.; HOLLANDER, J.; RIPPLE, M.O.; WEINDRUCH, R. Adult-onset energy restriction of rhesus monkeys attenuates oxidative stress-induced cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. Journal of Nutrition, v. 127, p.2293-301, 1997.
- KOWALCHUCK, J.M.; CURI, R.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. Biochemical Journal, v.249, p.705-8, 1988.
- LAMBERT, E.V.; WOODING, G.; LAMBERT, M.I.; KOESLAG, J.H. ; NOAKES, T.D. Enhanced adipose tissue lipoprotein lipase activity in detrained rats: independent of changes in food intake. Journal of Applied Physiology, v.77, n.6, p.2564-71, 1994.
- LANCHA JUNIOR, A. H. Papel da geração de oxaloacetato no exercício físico moderado em ratos: consequências da suplementação de aspartato, asparagina e carnitina. São Paulo, 1993. 76p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- LANDMANN, R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. European Journal of Clinical Investigation, v. 22, p.30-6, 1992. Supplement 1.

- LANE, M.A.; BAER, D.J.; RUMPLER, W.V.; WEINDRUCH, R.; INGRAM, D.K.; TILMONT, E.M.; CUTLER, R. G. ; ROTH, G.S. Calorie restriction lowers body temperature in rhesus monkeys, consistent with a postulated anti-aging mechanism in rodents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.93, p. 4159-64, 1996.
- LARUE-ACHAGIOTS, C.; RIETH, N.; GOUBERN, M.; LAURY, M.C. ; LOUIS-SYLVESTRE, J. Exercise-training reduces BAT thermogenesis in rats. Physiology & Behavior, v.57, n.5, p.1013-17, 1995.
- LASS, A.; SOHAL, B.H.; WEINDRUCH, R.; FORSTER, M.J. ; SOHAL, R.S. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. Free Radical Biology & Medicine, v. 5, n.9, p.1089-97, 1998.
- LEAKEY, J.E.A; CHEN, S.; MANJGALADZE, M.; TURTURRO, A.; DUFFY, P.H.; PIPKIN, J.L. ; HART, R.W. Role of glucocorticoids and 'Caloric stress' in modulating the effects of caloric restriction in rodents. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 719, n.31, p.171-94, 1994.
- LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Sarvier, 1990.
- LEWIS, C.E. ; MCGEE, J. O'D., eds. The natural immune system: the macrophage. Oxford, IRL Press, 1992.
- LOWRY, O.H.; ROSEBRUGH, N.J.; FARR, A.L. ; RANDALL, R.J. Proteins measurements with folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v.193, p.265-75, 1951.
- LU, Q., CEDDIA, W.A., PRICE, E.A., YE, S.M. ; WOODS, J.A. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumour cytolysis in young and old mice. American Journal of Physiology, v. 276, p. R482-R489, 1999.
- MACHADO, U.F. Alterações no conteúdo tecidual de transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 na obesidade: papel da resistência insulínica. São Paulo, 1997. 93p. Tese (Livre Docência) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

- MACHADO, U.F.; NOGUEIRA, C.R. ; CARPINELLI, A.R. Obesity is the major cause of alterations in insulin secretion and calcium fluxes by isolated islets from aged rats. Physiology & Behavior, v. 52, n. 4, p. 717-21, 1992.
- MACKINNON, L.T. Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. International Journal of Sports Medicine, v.19, p.S205-11, 1998. Supplement.
- _____. Advances in exercise immunology. Champaign, Human Kinetics, 1999.
- McARDLE, W.D.; KATCH, F.I. ; KATCH, V.L. Fisiologia do exercício: energia , nutrição e desempenho humano. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.
- McKAY, C.M.; CROWELL, M.F. ; MAYNARD, L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. Journal of Nutrition, v.10, p.63-8, 1935.
- MAKINODAN, T; KAY, M.M.B. Age influence on the immune system. Advances in Immunology, v.29, p.287-332, 1980.
- MARTIN III, W.H. Effects of acute and chronic exercise on fat metabolism. Exercise and Sport Sciences Reviews, v.24, p.203-31, 1996.
- MASORO, E.J. Potential role of the modulation of fuel use in the antiaging action of dietary restriction. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 663, n. 21, p.403-11, 1992.
- MEURET, G . ; HOFFMANN, G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. British Journal of Haematology, v.24, p.275-85, 1973.
- MILLER, R.A. The aging immune system: primer and prospectus. Science, v. 273, n. 5, p.70-4, 1996.
- NEWSHOLME, E.A. ; LEECH, A.R. Biochemistry for the medical science. New York, John Wiley & Sons, 1989.

- NEWSHOLME, E.A.; NEWSHOLME, P.; CURI, R.; CRABTREE, B. ; ARDAWI, S.M. Glutamine metabolism in different tissues. In: KINNEY, J.M. ; BORUM, P.G., eds. Perspectives in clinical nutrition. Baltimore-Munich, Urban & Scharzenberg, 1989. p.71-98.
- NEWSHOLME, P.; GORDON, S. ; NEWSHOLME, E.A. Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. Biochemical Journal, v. 242, p. 631-6, 1987.
- NIEMAN, D.C. Exercise immunology: practical applications. International Journal of Sports Medicine, v.18, p.S91-S100, 1997. Supplement.
- NIEMAN, D.C.; MILLER, A.R.; HENSEN, D.A.; WARREN, B.J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R.L.; DAVIS, J.M.; BUTTERWORTH, D.E.; HERRING, J.L.; NEHLSEN-CANNARELLA, S.L. Effect of High- versus moderate-intensity exercise on lymphocytes subpopulations and proliferative response. International Journal of Sports Medicine, v.15, p.199-206, 1994.
- OMS - Organização mundial de Saúde (WHO) Population division, department of economic and social affairs. Ageing. Texto disponível na internet, <http://www.popin.org/pop1998/8.htm> [15 maio 2000].
- ONU - Organização das Nações Unidas Relatório sobre o desenvolvimento humano no Brasil, 1996. O novo padrão demográfico. Texto disponível na internet, <http://www.undp.org.br/hdr/hdr96/rdhb1-4.htm> [15 maio 2000].
- ORGEL, L.E. The maintained of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging: a correction. Proceedings of the National Academy Science of the United States of America, n.67, p.1476, 1970.
- ORTEGA, E.; COLLAZOS, M.E.; BARRIGA, C.; DE LA FUENTE, M. Stimulation of the fagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. European Journal of Applied Physiology, v.64, p.323-7, 1992.
- PACHECO-SÁNCHEZ, M. ; GRUNEWALD, K.K. Body fat deposition: effects of dietary fat and two exercise protocols. Journal of the American College of Nutrition, v.13, n.6, p.601-7, 1994.

- PAGANELLI, R.; QUINTI, I.; FAGIOLO, U.; COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; GUERRA, E.; SANSONI, P.; PUCILLO, L.P.; SCALA, E.; COZZI, E.; BERTOLLO, D.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. Clinical and Experimental Immunology, v.90, p.351-4, 1992.
- PAHLAVANI, M.A.; HARRIS, M.D. ; RICHARDSON, A. The age-related decline in the induction of IL-2 transcription is correlated to changes in the transcription factor NFAT. Cellular Immunology, v. 165, p. 84-91, 1995.
- PAPA, P.C.; SERAPHIM, P.M. ; MACHADO, U.F. Loss of weight restores GLUT4 content in insulin-sensitive tissues of monosodium glutamate-treated obese mice. International Journal of Obesity. v.21, p.1065-70, 1997.
- PARRY-BILLINGS, M.; LEIGNTON, B.; DIMITRIADIS, G.D.; DE VASCONCELOS, P.R.L.; NEWSHOLME, E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis. Interantional Journal of Biochemistry, v.21, p.419-23, 1989.
- PAWELEC, G.; EFFROS, R.B.; CARUSO, C.; REMARQUE, E.; BARNETT, Y. ; SOLANA, R. T cells and aging (update February 1999) Frontiers in Bioscience, v.4, n. 1, p.216-69, 1999.
- PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H. How physical exercise influences the establishment of infections. Sports Medicine, v.19, p. 393-400, 1995.
- PEDERSEN, B.K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI Recovery of the immune system after exercise. Acta Physiologica Scandinavica, v.162, p.325-332, 1998.
- PETERSMARK, K.; RODRÍGUEZ, J.R.; MATOS, M.I.; GONZÁLEZ, M.J. Regional differences in fat cell lipolytic mechanisms: A critical review. Puerto Rico Health Sciences Journal, v.14, n.1, 1995.
- PICK, E. ; MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassay reader. Journal of Immunological Methods, v.46, p.211-26, 1981.
- PLAYFAIR, J.H.L. Immunology at a glance. London, Blackwell Sciene, 1996.

- POLLOCK, M.L. ; WILMORE, J.H. Exercícios na saúde e na doença: avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação. Rio de Janeiro, Medsi, 1993.
- POTTER, B.J.; SORRENTINO, D. ; BERK, P.D. Mechanisms of cellular uptake of free fatty acids. Annual Reviews of Nutrition, v.9, p.253-70, 1989.
- PROCTOR, D.N.; BALAGOPAL, P.; NAIR, K.S. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. Journal of Nutrition, v. 128, p.351S-5S, 1998.
- RAMSEY, J.J.; ROECKER, E.B.; WEINDRUCH, R.; KEMNITZ, J.W. Energy expenditure of adult male rhesus monkeys during the first 30 mo of dietary restriction. American Journal of Physiology, v.272, n. 35, p.E901-7, 1997.
- RANALLO, R.F. ; RHODES, E.C. Lipid metabolism during exercise. Sports Medicine, v.26, v.1, p.29-42, 1998.
- ROBINSON, D.S. The function of the plasma triglycerides in fatty acid transport. In: FLORKIN, M.; STOTZ, H., eds. Comprehensive biochemistry, lipid metabolism. Amsterdam, Elsevier, 1970. v.18.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. The Journal of Biological Chemistry, v. 239, n. 2, p.375-80, 1964.
- ROIT, I.; BROSTOFF, J. ; MALE, D. Immunology. London, Mosby, 1996.
- ROTHSTEIN, M. Altered proteins, errors and aging. In: SEGAL, H.L.; ROTHSTEIN, M.; BERGAMINI E., eds. Protein metabolism in aging. New York, Wiley-Liss, 1990. p.3-14.
- SALWAY, J.G. Metabolism at a glance. Oxford, Blackwell Science, 1995.
- SEIP, R.L.; ANGELOPOULOS, T.J. ; SEMENKOVICH, C.F. Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. American Journal of Physiology, v.268, n.31, p.E229-E236, 1995.
- SERAPHIM, P.M. Quantificação do transportador de glicose (GLUT 4) em ratos Wistar espontaneamente obesos. São Paulo, 1996. 80p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
- SHEPHARD, R.J. Physical activity, training and the immune response. Carmel, Cooper Publishing Group, 1997.

- _____. Aging and exercise. In: FAHEY, T.D., ed. Encyclopedia of Sports Medicine and Science, Internet Society for Sport Science: <http://sporsci.org>, 1998.
- SHEPHARD, R.J.; RHIND, S. ; SHEK, P.N. Exercise and immune system: natural killer cells, interleukins and related responses. Sports Medicine, v.18, n.5, p.340-369, 1994.
- SHINKAI, S.; KONISHI, M. ; SHEPHARD, R.J. Aging, exercise, training, and the immune system. Exercise Immunology Review, v.3, p.68-95, 1997.
- SHINKAI, S.; SHORE, S.; SHEK, P.N. ; SHEPHARD, R.J. Acute exercise and immune functions: relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. International Journal of Sports Medicine, v.13, p.452-61, 1992.
- SIMSOLO, R. B.; ONG, J.M. ; KERN, P.A. The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. Journal of Clinical Investigation, v.92, p.2124-30, 1993.
- SIMSON, E.L.; GOLD, R.M. The Lee obesity index vindicated? Physiology & Behavior, v.29, p.371-6, 1982.
- SPENCE, A.P. Biology of human aging. New Jersey, Prentice Hall, 1995.
- SPROTT, R.L. Diet and calorie restriction. Experimental Gerontology, v. 32, p. 205-14, 1997.
- STANSBIE, D., BROWNSEY, R.W.; CRETAAZ, M; DENTON, R.M. Acute affects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. Biochemical Journal, v.160, p.413-6, 1976.
- SZILARD, L. On the nature of the aging process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, n.45, p. 30-45, 1959.
- TIMIRAS, P.S., ed. Physiological basis of aging and geriatrics. 2. ed. Boca Raton, CRC Press, 1994.

- TREMBLAY, A.; SIMONEAU, J.A. ; BOUCHARD, C. Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. Metabolism, v.43, n.7 , p.814-8, 1994.
- TSENG, B.S.; MARSH, D.R.; HAMILTON, M.T.; BOTH, F.W. Streng and aerobic straining attenuate muscle wasting and improve resistance to the development of disability with aging. Journal of Gerontology, v.50A, p.113-9, 1995.
- TURCOTTE, L.P.; HESPEL, P.J.L.; GRAHAM, T.E. ; RICHTER, E.A. Impaired plasma FFA oxidation imposed by extreme CHO deficiency in contracting rat skeletal muscle. Journal of Applied Physiology, v.77, p.517-25, 1994.
- VAN NIEUWENHOVEN, F.A.; VAN DER VUSSE, G.J ; GLATZ, J.F.C. Membrane-Associated and Cytoplasm Fatty Acid-Binding Proteins. Lipids, v.31, p.S223-S227, 1996. Supplement.
- VAZIRI, H.; SCHÄCHTER, F.; UCHIDA, I.; EWI, L.; EFFROS, R.; COHEN, D. ; HARLEY, C.B. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy.h 21 human lymphocytes. American Journal of Human Genetics, n.52, p.661-7, 1993.
- VEERKAMP, J.H. Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins. Proceedings of the Nutrition Society, v.54, p. 23-37, 1995.
- VENKATRAMAN, J.T. ; FERNANDES, G. Exercise, immunity and aging. Aging of Clinical Experimental Research, v.9, p.42-56, 1997.
- VIEIRA, R.; HAEBISCH, H.; KOKUBUN, E.; HELL, N.S. ; CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.31, p.387-94, 1988.
- VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S. ; CURI, R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. Arquivos de Biologia e Tecnologia, v. 33, p. 819-29, 1990.
- WALFORD, R.L. Immunologic theory of aging: current status. Federation Proceedings, n.33, p. 2020-7, 1974.
- WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. Scientific American, january, p.32-8, 1996.

- WEINDRUCH, R.; SOHAL, R.S. Caloric intake and aging. The New England Journal of Medicine, v. 337, p. 986-94, 1997.
- WEINECK, J. Biologia do Esporte. São Paulo, Editora Manole, 1991.
- WICK, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P., BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTEIN, B. Diseases of aging. Vaccine, v. 18, p.1567-83, 2000.
- WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by small intestine. Journal of Biological Chemistry, v. 249, p.5070-9, 1974.
- WOLFE, R.R.; KLEIN, S.; CARRARO, F. ; WEBER, J.M. Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. American Journal of Physiology, v.258, p.E382-E389, 1990.
- YEAMAN, S.J. Hormone-sensitive lipase – a multipurpose enzyme in lipid metabolism. Biochemical and Biophysical Acta, v.1052, p.128-32, 1990.
- YU, S.; ABEL, L. ; GLOBERSON, A. Thymocyte progenitors and T cell development in aging. Mechanisms of Ageing and Development, v.94, p.103-11, 1997.

ANEXO I Progressão do peso corporal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental. Os dados correspondem à média de peso semanal em gramas (g) $\pm$ EPM (n).

	AD		ENV		RC-4		RC-6		EX	
	Peso (g)									
INÍCIO			456,6 ±10,10	(37)	426,8 ±24,70	(9)	472,7 ±13,00	(21)	440,0 ±10,90	(21)
1ª Sem.			456,7 ±10,30	(37)	391,5 ±24,90	(9) [#]	454,1 ±14,60	(21)	435,7 ±9,90	(21)
2ª Sem.			456,7 ±10,60	(37)	374,5 ±20,80	(9) [#]	420,3 ±13,40	(21) [£]	424,3 ±9,80	(21)
3ª Sem.			455,3 ±11,30	(37)	352,0 ±20,20	(9) [#]	406,5 ±13,00	(21) ^{#£}	416,6 ±9,20	(21)
4ª Sem.			477,0 ±10,30	(45)	366,0 ±20,30	(9) ^{*#}	369,9 ±13,00	(21) ^{#£}	416,9 ±9,70	(21)
5ª Sem.			470,9 ±15,70	(23)			374,5 ±12,00	(21) ^{#£}	411,7 ±8,80	(21) [#]
6ª Sem.	271,7 ±15,50	(6)	473,0 ±15,10	(23) [*]			383,9 ±11,80	(21) ^{*#£}	405,0 ±8,60	(21) ^{*#}

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

£ p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

£ p < 0,05 para comparação com valores obtidos no INÍCIO do período experimental.

ANEXO II - Consumo diário de ração dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro e seis semanas (RC-4/6) e EXERCITADOS (EX), durante o período experimental . Os dados correspondem à média de ração em gramas (g) $\pm$ EPM (n).

	Consumo de Ração	
	Peso (g)	
AD	21,8 $\pm$ 1,1	(6)
ENV	22,9 $\pm$ 0,8	(14)
RC-4/6	11,7 $\pm$ 0,3	(17) * #
EX	22,0 $\pm$ 0,7	(13) &

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

ANEXO III - Peso relativo dos tecidos adiposos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em g de tecido / 100 g de peso corporal $\pm$ EPM (n).

	TAE	TARP	TAME	TAM
	Peso relativo (g de tecido / 100 g de peso corporal)			
AD	0,949 $\pm$ 0,049 (9)	0,806 $\pm$ 0,084 (9)	0,473 $\pm$ 0,046 (9)	0,106 $\pm$ 0,006 (8)
ENV	1,713 $\pm$ 0,119 (22) *	1,791 $\pm$ 0,138 (22) *	0,959 $\pm$ 0,079 (22) *	0,094 $\pm$ 0,006 (21)
RC-4	0,970 $\pm$ 0,224 (6) #	0,764 $\pm$ 0,250 (5) #	0,410 $\pm$ 0,105 (6) #	0,119 $\pm$ 0,029 (6)
RC-6	0,942 $\pm$ 0,123 (8) #	0,535 $\pm$ 0,114 (8) #	0,279 $\pm$ 0,038 (8) #	0,056 $\pm$ 0,005 (8) [£]
EX	1,031 $\pm$ 0,159 (8) #	0,878 $\pm$ 0,150 (8) #	0,518 $\pm$ 0,072 (8) #	0,155 $\pm$ 0,017 (8) # &

TAE = Tecido adiposo epididimal; TARP = Tecido adiposo retroperitoneal; TAME = Tecido adiposo mesentérico; TAM = Tecido adiposo marron.

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

[£] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-4.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

ANEXO IV - Porcentagem de gordura dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC-4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n).

	% de Gordura		
AD	9,5	$\pm 1,1$	(7)
ENV	17,5	$\pm 1,0$	(17) *
RC4	11,4	$\pm 2,5$	(5) #
RC6	8,6	$\pm 1,1$	(8) #
EX	10,0	$\pm 0,9$	(8) #

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

ANEXO V - Quadro equivalente aos dados utilizados para as correlações lineares apresentadas na FIGURA 11.

			Peso total (g)				Lípides (mg / g de tecido)
	Animal	%	TAE	TARP	TAME	TAM	CARCAÇA
AD	105	10,3	3,202	3,160	1,337	0,300	87,70
	106	5,6	3,520	1,656	1,131	0,304	42,86
	107	8,1	3,091	2,205	1,019	0,355	66,37
	108	7,7	3,046	2,184	1,702	0,445	66,40
ENV	3	26,7	9,715	16,104	9,040	0,594	241,95
	4	25,5	8,570	12,437	6,795	0,438	231,93
	5	20,9	12,508	13,710	6,466	0,393	174,15
	9	16,5	8,201	6,811	1,927	0,323	136,59
	10	18,8	7,557	8,617	3,978	0,406	167,31
	11	20,5	11,849	12,093	5,155	0,550	177,54
	12	21,0	12,134	10,898	4,563	0,548	168,17
	13	7,4	2,128	1,589	1,209	0,454	81,47
	14	18,1	9,529	7,605	5,690	0,601	168,02
	15	15,2	5,550	4,942	2,470	0,370	119,59
	18	13,0	4,448	4,773	2,962	0,402	114,04
	19	15,7	5,648	7,374	4,970	0,794	137,30
RC-4	428	19,0	6,304	5,866	3,458	0,285	161,6
	429	14,4	7,242	5,255	2,071	0,142	117,1
	438	9,2	3,162	1,437	1,276	0,618	56,7
	439	9,9	2,305	1,465	1,042	0,658	54,8
	440	4,3	2,282	1,017	1,140	0,690	43,9

continua

ANEXO V - Quadro equivalente aos dados utilizados para as das correlações lineares apresentadas na FIGURA 11. (continuação)

			Peso total (g)				Lípides (mg / g de tecido)
	Animal	%	TAE	TARP	TAME	TAM	CARCAÇA
RC-6	33	6,1	4,039	1,506	0,703	0,146	53,62
	34	7,2	2,463	1,173	0,781	0,269	67,45
	35	8,1	4,352	1,550	0,852	0,167	71,70
	36	4,6	2,397	1,708	1,341	0,175	35,42
	40	9,2	3,518	1,391	0,626	0,218	83,85
	41	7,1	1,844	1,105	0,988	0,218	64,77
	42	13,1	4,497	3,695	1,656	0,274	118,92
	43	13,3	7,284	5,214	1,884	0,268	113,05
EX	61	9,1	3,708	3,808	1,791	0,555	74,93
	62	9,0	2,828	1,700	1,215	0,580	81,99
	63	13,1	7,017	6,031	3,034	0,818	101,85
	64	12,8	5,697	3,961	2,674	0,824	101,38
	65	8,4	3,074	2,267	1,306	0,407	74,62
	66	5,6	2,254	0,976	1,338	0,527	64,87
	67	11,0	5,138	5,555	3,340	0,677	115,05
	68	11,3	3,170	4,078	1,998	0,541	100,74

ANEXO VI - Atividade máxima da enzima citrato sintase no músculo gastrocnêmio dos animais ENVELHECIDOS (ENV) e EXERCITADOS (EX). Os dados estão expressos em nmol / minuto x mg de proteína⁻¹, e correspondem à média $\pm$ EPM (n).

<i>Citrato sintase</i>			
(nmol / minuto x mg de proteína ⁻¹)			
ENV	0,161	$\pm$ 0,019	(3)
EX	0,693	$\pm$ 0,147	(4) [#]

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

ANEXO VII - Porcentagem de fagocitose e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n), da porcentagem de fagocitose e nmol / 1 hora $\times$ mg proteína⁻¹ de H_2O_2 .

	Fagocitose		H_2O_2	
	(%)		(nmol / 1 hora $\times$ mg proteína ⁻¹)	
AD	9,4 $\pm$ 1,9	(7)	29,73 $\pm$ 7,31	(7)
ENV	16,5 $\pm$ 6,8	(6)	33,43 $\pm$ 12,70	(7)
RC-6	40,0 $\pm$ 5,6	(10)	42,91 $\pm$ 7,53	(5)
EX	65,2 $\pm$ 4,1	(5) ^{*#&}	45,44 $\pm$ 6,86	(10)

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

ANEXO VIII - Índice de proliferação de linfócitos presentes no sangue dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n).

	Índice de proliferação			
	CONA		LPS	
AD	1,10 $\pm$ 0,03	(11)	1,31 $\pm$ 0,08	(12)
ENV	1,56 $\pm$ 0,25	(5)	2,07 $\pm$ 0,51	(5)
RC6	1,50 $\pm$ 0,19	(7)	1,95 $\pm$ 0,50	(9)
EX	0,84 $\pm$ 0,04	(10) * ^{&}	1,28 $\pm$ 0,07	(4)

Mitógenos: CONA - Concanavalina ; LPS - Lipopolissacarídeo.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

[&] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.

ANEXO IX - Índice de proliferação de linfócitos presentes nos linfonodos mesentéricos dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média de proliferação $\pm$ EPM (n).

	Índice de proliferação			
	CONA		LPS	
AD	1,39 $\pm$ 0,12	(12)	1,39 $\pm$ 0,08	(10)
ENV	1,47 $\pm$ 0,18	(4)	1,23 $\pm$ 0,10	(4)
RC6	1,27 $\pm$ 0,14	(8)	1,32 $\pm$ 0,10	(7)
EX	1,08 $\pm$ 0,03	(8)	1,22 $\pm$ 0,07	(9)

Mitógenos: CONA - Concanavalina ; LPS - Lipopolissacarídeo.

APÊNDICE I - Progressão de peso dos animais ADULTOS (AD) durante o período de seis semanas. Os dados correspondem à média de peso em gramas (g) $\pm$ EPM (n).

	AD		
	Peso (g)		
INÍCIO¹	271,1	$\pm 15,5$	(6)
1ª Sem.	308,6	$\pm 18,9$	(6)
2ª Sem.	333,6	$\pm 18,4$	(6)
3ª Sem.	345,7	$\pm 19,9$	(6)
4ª Sem.	299,6	$\pm 16,4$	(6)
5ª Sem.	316,0	$\pm 25,2$	(6)
6ª Sem.	358,1	$\pm 23,6$	(6)

¹ O peso do INÍCIO corresponde a 2 meses e 19 dias de idade.

APÊNDICE II - Composição da ração comercial Nuvilab CR1.

Ração	
Carboidratos	52%
Proteínas	21%
Gorduras	4%

Fonte: LANCHAS JUNIOR, 1993.

APÊNDICE III - Índice de LEE dos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC-6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média $\pm$ EPM (n).

	Índice de Lee		
AD	0,333	$\pm$ 0,007	(10)
ENV	0,326	$\pm$ 0,007	(6) *
RC-6	0,292	$\pm$ 0,005	(5) #
EX	0,318	$\pm$ 0,004	(8)

* $p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

$p < 0,05$ para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

APÊNDICE IV - Peso total dos tecidos e órgãos correspondentes aos animais ADULTOS (AD), ENVELHECIDOS (ENV), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por quatro semanas (RC4), sob RESTRIÇÃO CALÓRICA por seis semanas (RC6) e EXERCITADOS (EX). Os dados correspondem à média do peso em gramas (g) de tecido $\pm$ EPM (n).

	AD		ENV		RC-4		RC-6		EX	
	Peso (gramas)									
TAE	2,852 ± 0,206	(9)	7,745 ± 0,581	(22) *	3,690 ± 1,028	(6) [#]	3,799 ± 0,607	(8) [#]	4,111 ± 0,586	(8) [#]
TARP	2,390 ± 0,253	(9)	8,225 ± 0,764	(22) *	3,008 ± 1,05	(5) [#]	2,168 ± 0,524	(8) [#]	3,547 ± 0,632	(8) [#]
TAME	1,400 ± 0,127	(9)	4,396 ± 0,423	(22) *	1,548 ± 0,446	(6) [#]	1,104 ± 0,166	(8) [#]	2,087 ± 0,294	(8) [#]
TAM	0,316 ± 0,022	(8)	0,424 ± 0,030	(21)	0,421 ± 0,108	(6)	0,217 ± 0,018	(8) [#]	0,616 ± 0,052	(8) * [#] _{&}
SÓLEO	0,156 ± 0,015	(4)	0,341 ± 0,026	(10) *	0,280 ± 0,01	(3)	0,330 ± 0,019	(6) *	0,259 ± 0,017	(4)
EDL	0,234 ± 0,005	(4)	0,373 ± 0,019	(10) *	0,304 ± 0,016	(3)	0,325 ± 0,030	(5)	0,324 ± 0,013	(4)
GASTRO	3,334 ± 0,175	(4)	5,164 ± 0,396	(10) *	3,732 ± 0,126	(3)	4,142 ± 0,173	(6)	4,438 ± 0,123	(4)
FÍGADO	8,77 ± 0,40	(8)	11,37 ± 0,57	(21) *	9,46 ± 1,37	(6)	10,32 ± 0,33	(8)	9,46 ± 0,35	(8)
ADRENAIS	0,054 ± 0,006	(8)	0,044 ± 0,003	(26)	0,040 ± 0,005	(9)	0,054 ± 0,002	(11)	0,038 ± 0,009	(8)
TIMO	0,307 ± 0,020	(12)	0,277 ± 0,019	(30)	0,192 ± 0,021	(9) *	0,097 ± 0,014	(6) * [#]	0,206 ± 0,020	(8)
BAÇO	0,617 ± 0,028	(8)	0,875 ± 0,055	(20) *	0,542 ± 0,053	(6) *	0,798 ± 0,084	(7)	0,794 ± 0,063	(8)
CARCAÇA	262,0 ± 11,86	(9)	397,8 ± 10,37	(22) *	323,0 ± 25,5	(6) [#]	350,1 ± 14,64	(8) *	334,6 ± 10,03	(8) * [#]

TAE = Tecido adiposo epididimal; TARP = Tecido adiposo retroperitoneal; TAME = Tecido adiposo mesentérico; TAM = Tecido adiposo marron; SÓLEO = Músculo Solear; GASTRO = Músculo gastrocnêmio e EDL = Músculo extensor digitório longo.

* p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ADULTOS.

[#] p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais ENVELHECIDOS.

& p < 0,05 para comparação com valores obtidos para os animais RC-6.