Marcela Meneguello Coutinho

**EFEITO DO TREINAMENTO MODERADO SOBRE O
METABOLISMO DE
MACRÓFAGOS DE RATOS ENVELHECIDOS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2004

**EFEITO DO TREINAMENTO MODERADO SOBRE O METABOLISMO DE
MACRÓFAGOS DE RATOS ENVELHECIDOS**

MARCELA MENEGUELLO COUTINHO

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração:
Fisiologia e Biofísica

Orientador:
Prof. Dr. Luís Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa

São Paulo
2004

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Coutinho, Marcela Meneguello.

Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos / Marcela Meneguello Coutinho. -- São Paulo, 2004.

Orientador: Luís Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Exercício Físico e reposta imune.

Versão do título para o inglês: Effect of aerobic training on macrophage metabolism obtained from old rats.

Descritores: 1. Exercício 2. Envelhecimento 3. Macrófago 4. Sistema imune 5. Ratos 6. Metabolismo celular I. Costa Rosa, Luís Fernando Bicudo Pereira II. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB163/2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Marcela Meneguello Coutinho

Tese: Efeito do Treinamento Moderado Sobre o Metabolismo
 de Macrófagos de Ratos Envelhecidos

Orientador: Luís Fernando Bicudo Pereira Costa Rosa

A Comissão julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em
sessão pública realizada a ____/____/____, considerou a:

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Examinador(a): Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Examinador(a): Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Examinador(a): Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

Presidente: Assinatura _____

Nome _____

Instituição _____

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3813-0900 - telefax : (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 027/2001, sobre o projeto intitulado "*Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos*" sob a responsabilidade Marcela Oliveira Meneguello está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 16/04/2001.

(We certify that the protocol nº 027/2001 about "*Effect of aerobic training on macrophage metabolism obtained from old rats*" with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 16/04/2001 meeting.)

São Paulo, 16 de abril de 2001.

Prof. Dra. Estela Maris A. F. Bevilacqua
Coordenadora da CEEA

Prof. Dra. Maria Inês Nogueira
Secretária da CEEA

DEDICATÓRIA

Para:

Beto, Thiago, Palo, Clacla, Minduim e Vó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

- * Ao GG, pelas oportunidades que me propiciaram um grande crescimento profissional e pessoal.
- * Aqueles que tiveram uma palavra de apoio e carinho nas horas mais difíceis: Cortez, Mari, Fefa, Eivor, Cida, Rosana e minha querida Marilene.
- * Ao Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima, Depto. Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, pelos reagentes e método de dosagem de óxido nítrico (NO^-).
- * Ao Prof. Dr. Roger Chamas, Depto. de Radiologia da Faculdade de Medicina – USP, pelo método de quimiotaxia e por gentilmente nos ceder as placas para os primeiros experimentos.
- * A estatística Cleide Rosana Duarte Prisco, do Depto. de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP, pela consultoria e auxílio nas análises estatísticas.
- * As pessoas que tiveram uma participação direta na realização deste trabalho: Fernanda Bredariol Velhote, Anielle Cristine Agnelo D'Angelo, Daniel Fernandes de Souza, Marcus Vinícius Giampietro, Leonardo L. Alves, Alex Shimura, e Wilton Darleans dos Santos Cunha. Vocês foram demais, muuuuuuuitttttoooo obrigada!
- * Ao pessoal do lab: Ana Carolina, Bia, Cida, Fred, Graziela, Helio, Juliana, Leandro, Mauro, Miguel, Natália, Ronaldo, Uchida, Zeca.
- * Aos companheiros de pós: André, Anelisa, Frank, Mauro, Mônica, Navarro, Sal.

- ✖ Ao José Maria, da Secretaria do Programa Pós Graduação do Depto. de Fisiologia Humana, ICB – USP, por estar sempre disponível e nos manter sempre informados.
- ✖ Ao pessoal da biblioteca: Antonio Paulo Gomes da Silva, Edilson Oliveira Bernadino, Elza de Souza - *in memorian*, Eva Aparecida da Silva Oliveira, Delza Piruna Martins, Isabel Tereza Lopes de Andrade, Jacinta de Oliveira Carvalho, Maria do Socorro Bezerra Rocha, Maria José de Jesus Carvalho, Maria Valmira de Lima Lopes, Renata Maria dos Santos, Tereza Cristina Soutto Mayor, Wilkizilania Karla Paiva, Yoshiyuki Nakatsubo.
- ✖ Ao pessoal do xerox pelo atendimento prestativo e eficiente: Juca, Silmara, Talita, Deise, Kelly, Lafaiete, Gerson, Juliane, Rogério.
- ✖ A FAPESP por financiar este projeto (00/06065-7).

RESUMO

COUTINHO, M.M. Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos. 2004. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Com o avanço da idade observamos a queda na eficiência do Sistema Imunológico, estando relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade em idosos. Dentre as células do sistema imunológico encontramos os macrófagos que garantem ao organismo a capacidade de defesa contra infecções, proliferação de células tumorais e reparo de tecidos. Uma das formas de reverter ou até mesmo restaurar algumas das funções imunológicas comprometidas com o processo de envelhecimento é a utilização da prática de exercício aeróbio moderado. Por este motivo, estudamos o efeito do treinamento moderado em natação sobre a função e o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos. Em macrófagos obtidos da cavidade peritoneal, observamos uma melhora da capacidade funcional, através do aumento das funções de aderência, quimiotaxia e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico ($NO\cdot$), que foram acompanhadas pelo aumento no metabolismo de glicose (aumento de consumo e da enzima *hexoquinase*), contribuindo para a melhora da função imune no envelhecimento.

PALAVRAS CHAVE: Exercício, Envelhecimento, Macrófago, Sistema Imune, Ratos, Metabolismo Celular.

ABSTRACT

COUTINHO, M. M. Effect of aerobic training on macrophage metabolism obtained from old rats. 2004. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Disorders of the immune function contribute to the high incidence of infections and cancer among elderly people. Macrophages play a crucial role in immune response, destroying bacteria, parasites, viruses and tumour cells through various mechanisms of action. Exercise is able to induce changes and modulate the immune response. The aim of the present work was to evaluate the function and metabolism of macrophages obtained from old rats submitted to moderate exercise training. Sedentary adult (2 – 4 months), old (15 – 18 months) and trained old rats were studied. The results show an increase in the function of macrophages obtained from the peritoneal cavity of trained old rats compared with old rats, regarding chemotaxis, hydrogen peroxide and nitric oxide production, as well a enhanced glucose consumption and increased maximal activity of the enzymes hexokinase and glutaminase. In summary, our results indicate that exercise (moderate training) stimulates some functional aspects of macrophages of old rats, with a concomitant increase in glucose metabolism.

KEY WORDS: Exercise, Aging, Macrophage, Immune System, Rats, Cellular Metabolism.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS¹

(n)	Número de amostras
AD	Animais Adultos
CD	Complexo de diferenciação
CFU-GM	Unidade formadora de colônia-granulócitos e macrófagos
CoA	Coenzima A
CPM	Contagem por minuto
CS	<i>Citrato sintase</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPM	Erro padrão da média
EV	Animais Envelhecidos
EV-TR	Animais Envelhecidos-Treinados
f-MLP	N - formyl - met - leu - phe
g	Gramas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HK	<i>Hexoquinase</i>
ICAM-1	"intercellular adhesion molecule-1"
IFN	"Interferon"
IL	Interleucina
iNOS	<i>Óxido nítrico sintetase</i>
ITRS	Infecções do trato respiratório superior
Km	Quilômetro
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
MHC	<i>Complexo de maior histocompatibilidade</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NK	"Natural killer"
NO·	Óxido nítrico
O ₂	Oxigênio
°C	Graus <i>Celsius</i>
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Tampão fosfato-salina
PG	Prostaglandina
PKC	<i>Proteína quinase C</i>
PMA	Éster de forbol-miristato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
Th	Linfócito T "helper" ou auxiliar
TNF	Fator de necrose tumoral

¹ As siglas e fórmulas químicas dos reagentes descritos no capítulo Materiais e Métodos estão apresentadas no Anexo 02.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	O Macrófago	16
2.2	Sistema Imunológico e Envelhecimento	20
2.3	Exercício e Sistema Imunológico	22
2.4	Macrófagos, Envelhecimento e Exercício	25
3	OBJETIVO	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Animais	29
4.2	Protocolo de Treinamento Aeróbio em Natação	30
4.3	Descrição dos Procedimentos Experimentais	31
4.4	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação do Treinamento Moderado em Natação	50
5.2	Caracterização dos Aspectos Funcionais de Macrófagos	50
5.3	Caracterização do Metabolismo de Macrófagos	55
6	DISCUSSÃO	63
6.1	Treinamento Moderado em Natação	67
6.2	Função de Macrófagos	68
6.3	Metabolismo de Macrófagos	80
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO 01	97
	ANEXO 02	98

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um aumento da população idosa mundial, e acredita-se que essa população aumente cada vez mais em proporções exponenciais. No Brasil, segundo o Censo 2000, os idosos representam cerca de 8% da população, totalizando 14.538.988 de habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2003) e as perspectivas para os próximos 20 anos é que 16% da população brasileira corresponda a indivíduos com idade acima dos 60 anos (Organização das Nações Unidas - ONU, 2000).

Com esse aumento da população idosa, cresce a preocupação com os problemas associados à saúde, já que com o avançar da idade aumenta muito a incidência de doenças em decorrência das alterações fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento. Com isso, observamos uma diminuição da qualidade de vida, acarretando o aumento das dificuldades enfrentadas pelos idosos, e principalmente, levando a um maior gasto financeiro com a área da saúde (WICK *et al*, 2000). Dessa forma, o estudo das alterações fisiológicas e a identificação de estratégias que possam minimizar ou até mesmo reverter estas alterações são de grande importância para o idoso e para a população em geral.

Dentre as alterações encontradas com o avanço da idade observamos a queda na eficiência de algumas funções do Sistema Imunológico, conhecida como imunosenesescência, e que segundo Pawelec *et al*. (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.

Várias são as células do Sistema Imunológico que sofrem alterações com o processo de envelhecimento e dentre elas encontramos os macrófagos, que fazem parte da primeira linha de defesa do organismo. Atualmente sabe-se que esta célula possui inúmeras funções que vão além daquelas exercidas na resposta imune inata, devido, principalmente, à sua grande capacidade secretora e de adaptação a diferentes condições metabólicas. Por este motivo o estudo de estratégias que atenuem os efeitos do envelhecimento sobre a função macrofágica pode refletir diretamente na condição física do idoso, melhorando sua qualidade de vida.

Uma das formas de reverter ou até mesmo restaurar algumas das funções imunológicas comprometidas com o processo de envelhecimento é a utilização da prática de exercício aeróbio moderado (Fielding e Evans, 1997; Hirokawa, 1997), que, como demonstrado por vários grupos de pesquisa, atua como imunomodulador da resposta imunológica (HIROKAWA, 1997; MACKINNON, 1998; MACKINNON, 2000; NIEMAN, 1997; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000; SHEPHARD *et al.*, 1994). Como ocorre com as outras células do Sistema Imunológico, o macrófago também sofre modificações induzidas pelo exercício (Ferrandes e De La Fuente, 1999; Meneguello, 2000), muito embora estas ainda não estejam sistematizadas.

Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a atuação do treinamento aeróbio moderado sobre a função e o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O envelhecimento pode ser visto como uma inadequação dos mecanismos homeostáticos, implicando num decréscimo da viabilidade ou aumento da vulnerabilidade ao estresse (tanto o estresse como fator interno ou externo ao organismo) (GREEN, 1994; *apud* 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 (IMAHORI, 1992; HIROKAWA, 1997; MAKINODAN e KAY, 1980). 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, 1998), fazendo com que, no envelhecimento, algumas mudanças em suas funções desestabilizem outros sistemas corporais. Estas interações dos sistemas corporais podem ocorrer principalmente entre as respostas dos sistemas neuroendócrino e imunológico, baseados no fato de que o sistema imunológico produz hormônios, neuropeptídeos, neurotransmissores e também, receptores para estes fatores; assim como o sistema neuroendócrino produz citocinas e seus receptores, ocorrendo uma regulação intra e intersistemas, principalmente por estes fatores solúveis (BESEDOVSKY e DEL REY, 1996).

O sistema imunológico é composto por inúmeras células, que atuam em diferentes etapas na resposta provocada por agentes externos ou malignidades. Os macrófagos, célula pertencente ao sistema imunológico inato, garantem ao organismo a capacidade de defesa contra infecções, proliferação de células tumorais, reparação de tecidos, além de atuarem como células apresentadoras de antígeno e células efetoras (estimulados pelos linfócitos) (LLOBERAS e CELADA, 2002). Por este motivo, estas células possuem grande importância na resposta imunológica, sendo seu funcionamento essencial para a manutenção do sistema imunológica no idoso.

2.1 O Macrófago

Os macrófagos são células da primeira linha de defesa do sistema imunológico que atuam basicamente nos processos inflamatórios e no controle do surgimento de células tumorais (TANG *et al.*, 2000; WOODS *et al.*, 2000). Isto ocorre em decorrência de sua participação em múltiplos eventos regulatórios, dos quais podemos destacar a promoção ou inibição da inflamação, atuação no reparo e renovação de tecidos, ação tumoricida e microbicida, e interação da imunidade inata e específica (HANDEL-FERNANDEZ e LOPÉZ, 2000; WOODS *et al.*, 2000).

Como todas as células do Sistema Imunológico, os Macrófagos são originados na medula óssea a partir da célula progenitora denominada Unidade Formadora de Colônia - Granulócitos e Macrófagos (*Colony-*

Forming Unit – Granulocyte Macrophage, CFU-GM) (GARTNER e HIATT, 1993).

A CFU-GM dá origem inicialmente aos monoblastos que proliferam e se diferenciam em pró-monócitos e posteriormente geram os monócitos (AUGER e ROSS, 1992).

Uma vez formados, os monócitos permanecem na medula óssea por cerca de 24 horas antes de entrar na circulação periférica (Furth e Van And Sluiter, 1986; Meuret e Hoffmann, 1973) aonde permanecem, em média, por 25 horas (AUGER e 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 e McGEE, 1992).

Após circularem pelo organismo, os monócitos migram e se fixam nos tecidos, tornando-se macrófagos residentes. Eles são encontrados na maioria dos tecidos e podem ser denominados segundo o lugar onde se encontram, como no fígado - células de 'Kupffer', sistema nervoso central - células microgliais, ossos - osteoclastos, pulmão - macrófagos alveolares, baço, medula óssea, intestino, entre outros.

Outra particularidade dos macrófagos é que estes podem ser encontrados em diferentes estados funcionais (residente, ativado e estimulado), determinados pelos sinais estimulatórios e inibitórios do microambiente em que eles se encontram, como ocorre na cavidade peritoneal onde os macrófagos residentes são considerados células com baixa atividade funcional (quiescente) (LU *et al.*, 1999).

Morfologicamente os macrófagos possuem formato irregular medindo 25 a 50 μm de diâmetro (Gartner e Hiatt, 1993) e fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, que tem como responsabilidade remover material ou células estranhas ao organismo, além de atuar nos processos de reparo tecidual (ROITT *et al.*, 2000). Assim como os outros fagócitos mononucleares, os macrófagos possuem grande capacidade de produção e secreção de moléculas, justificando assim as suas inúmeras atuações celulares (Allavena *et al.*, 2000), como nos mostra o Quadro 2.1.

Dentre as funções exercidas pelos macrófagos destacamos a sua capacidade de migração para os sítios em resposta à presença de fatores quimioatrativos (quimiotaxia), adesão, fagocitose e produção de moléculas com finalidade regulatória (ALLAVENA *et al.*, 2000; FERRANDEZ e DE LA FUENTE, 1999).

Com estas características, os macrófagos participam das interações bidirecionais da imunidade inata e a específica (ABBAS *et al.*, 2000). Na imunidade inata, dentre as principais funções exercidas pelos macrófagos, encontramos a capacidade de fagocitar partículas estranhas (microorganismos e macromoléculas) e produzir citocinas. 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 efectoras da imunidade celular e humoral.

Quadro 2.1 – Seleção de produtos secretados por fagócitos mononucleares.

Grupo funcional	Moléculas
Moléculas tóxicas de vida curta	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Intermediários reativos do oxigênio (Ex: H₂O₂) ✗ Intermediários reativos do nitrogênio (Ex: NO⁻)
Produtos da Ciclooxygenase / Lipoxigenase	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Prostaglandinas (PG E2) ✗ Leucotrienos (LT B4)
Enzimas e Fatores de coagulação	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Fatores tissulares: Fator IX, X, V e protrombina ✗ Ativadores / Inibidores de plasminogênio, tipo uroquinase
Componentes do Sistema Complemento	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Via Clássica (C1, C2, C3, C4, C5) ✗ Via Alternativa (Fator B, D e properdina)
Fatores de crescimento	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Fatores de crescimento derivados de plaquetas – (PDGF) ✗ Fatores de crescimento para fibroblasto
Fatores hematopoiéticos	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Fator estimulador da formação de colônias-macrófagos
Citocinas próinflamatórias primárias	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Interleucina-1 (IL-1), TNF (Fator de Necrose Tumoral), IL-6, IL-12, IL-18
Citocinas próinflamatórias secundárias	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Quimiocinas (‘monocyte chemotatic protein 1-4’)
Citocinas anti-inflamatórias	<ul style="list-style-type: none"> ✗ IL-10; ‘transforming growth factor β’
Receptores de citocinas	<ul style="list-style-type: none"> ✗ Receptor tipo II para IL-1, Receptor para TNF.

(Adaptado de ALLAVENA *et al.*, 2000).

Neste caso, o linfócito T é responsável pela liberação de citocinas que estimulam a sua capacidade microbicida e antitumorigênica (Lu *et al.*, 1999) e o linfócito B, responsável pela liberação de anticorpos que aumentam sua capacidade de reconhecimento (através do processo de opsonização)

(AUGER e ROSS, 1992). Desta forma, alterações na funcionalidade dos 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. A ativação dos linfócitos T ou 'Natural Killer' (NK) resulta na liberação de Interferon γ (INF- γ) que inicializa a ação antitumoricida no macrófago, através da produção de Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e do óxido nítrico (NO $\cdot$). Além disso, o INF- γ aumenta a sensibilidade do macrófago às substâncias que funcionam como 'gatilhos disparadores', entre as quais se destacam o lipopolissacarídeo (LPS), que estimula a atividade bactericida e o éster de forbol-miristato (PMA), que estimula a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (PICK e MIZEL, 1981).

2.2 Sistema Imunológico e Envelhecimento

A imunosenescência (alteração do sistema imunológico com o avanço da idade), segundo Pawelec *et al.* (1999) está relacionada à morbidade e mortalidade em seres humanos, além de aumentar a incidência de infecções, aumentos dos fenômenos auto-immunes e câncer (Wick *et al.*, 2000). 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.

Enquanto que para linfócitos já está bem estabelecida a redução de algumas de suas funções durante o processo de envelhecimento, para macrófagos existe ainda muita controvérsia, como podemos observar no Quadro 2.2, que resumidamente mostra alguns trabalhos que abordam o assunto.

Quadro 2.2 – Estudos sobre as alterações funcionais no envelhecimento.

Função	Alterações
Número de células	↔
Produção de IL-1	↓ (Makinodan e Kay, 1980)
Atividade fagocitária	↓ (De La Fuente, 1985) ↔ (Makinodan e Kay, 1980) ↑ (Costa Rosa et al., 1993; Ferrandez e De La Fuente, 1999)
Produção de H ₂ O ₂	↓ (Costa Rosa et al., 1993) ↑ (Ferrandez e De La Fuente, 1999)

Legenda: ↔ Igual; ↑ Aumento; ↓ Redução

Alguns autores sugerem que além das alterações funcionais nos macrófagos, há também mudanças na liberação dos mediadores inflamatórios, como o Óxido Nítrico (NO[•]) e as Prostaglandinas (PGs), como foi observado por Morrison *et al.* (1993) e Alvarez *et al.* (1996) em experimentos realizados *in vitro* e com o uso do LPS como estímulo.

Estes diferentes resultados acerca da função dos macrófagos podem ser fruto das diferentes técnicas adotadas, da diferença entre os locais em que as células foram obtidas (peritônio, pulmão...), do estado dos tecidos em

que as células foram obtidas, do estado funcional dos macrófagos (residentes, inflamatórios ou ativados), do estado de comprometimento de outras células do sistema imunológico (já que há uma grande interação entre elas) e da idade em que os animais foram estudados, pois se sabe que as alterações no Sistema Imunológico são tempo-dependente (FERRANDEZ e DE LA FUENTE, 1999).

2.3 Exercício e Sistema Imunológico

Uma das formas de se modular a resposta do sistema imunológico é através do exercício físico (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Sessões agudas de exercício ou aqueles realizados cronicamente (treinamento), podem, em decorrência da intensidade, duração, frequência e do tipo (estático e dinâmico) de atividade, alterar diversas funções do sistema imunológico (MACKINNON, 1998; NIEMAN, 1997; PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Uma característica do exercício agudo é a linfocitose, decorrente principalmente do aumento das células "Natural Killer" (NK), dos linfócitos T - CD4⁺ (do tipo "helper" ou auxiliar), dos linfócitos T - CD8⁺ (citotóxicos), dos linfócitos B - CD 19⁺ e dos Neutrófilos (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Provavelmente esta mobilização de células para o compartimento vascular ocorre em decorrência da estimulação dos receptores β adrenérgicos expressos nos respectivos tipos celulares (LANDMANN, 1992). Além de uma maior migração dos Leucócitos para o compartimento vascular durante o

exercício, há também uma redução na razão CD4⁺/CD8⁺, resultado de um maior aumento dos Linfócitos citotóxicos (CD8⁺) (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000).

Logo após a sessão de exercício há uma redução do número dos leucócitos circulantes (que estavam aumentados durante o exercício), com exceção dos Neutrófilos, que aumentam ainda mais após o término de uma longa sessão de exercício (McCARTHY e DALE, 1988).

Durante a prática de exercícios, estudos realizados em animais e seres humanos mostram uma redução da capacidade proliferativa dos linfócitos circulantes estimulados por agentes mitogênicos (NIELSEN e PEDERSEN, 1997). Para os linfócitos T esta redução permanece mesmo após o término do exercício, mas para linfócito B há um aumento ou manutenção da capacidade proliferativa (FIELD *et al.*, 1991).

Em contraste ao grande número de estudos realizados sobre exercício agudo, muito menos é conhecido sobre o efeito do treinamento físico sobre a resposta imunológica (PEDERSEN e HOFFMAN-GOETZ, 2000). Isto ocorre devido à dificuldade em separar o efeito do treinamento '*per se*' do efeito de uma sessão aguda de exercício, já que esse pode perdurar por 24 horas após um exercício intenso ou mesmo algumas horas após exercício moderado. Apesar desta dificuldade alguns estudos transversais e longitudinais têm sido realizados e as evidências indicam que de uma maneira geral, o exercício moderado praticado regularmente melhora

alguns parâmetros do sistema imunológico (Hirokawa, 1997; Mackinnon, 1998; Nieman, 1997; Nieman *et al.*, 1994; Pedersen *et al.*, 1998; Shephard *et al.*, 1994); enquanto que exercícios agudos e intensos causam um efeito oposto (NIEMAN, 1997), como ilustrados no Quadro 2.3

Quadro 2.3 - Modificações do sistema imunológico em decorrência do treinamento físico (parâmetros analisados em repouso).

Parâmetro	Modificação
Contagem de Leucócitos	↔
Contagem de Monócitos	↓ da Fagocitose se o treinamento é Intensificado
Contagem de Linfócitos	↔ ↓ linfócito T e linfócito Th se o treinamento é intensificado
Células "Natural Killer" (NK)	↑ da atividade ↓ da atividade se o treinamento é intensificado
Taxa de Proliferação Celular	↑
Imunoglobulinas	↑ ↓ se o treinamento é intensificado (também na estimulação <i>in vitro</i>)
Fatores Solúveis	↑ IL-1 ↓ de alguns elementos do Sistema Complemento se o treinamento é intensificado

Legenda: ↔ Igual; ↑ Aumento; ↓ Redução

(Adaptado de SHEPHARD *et al.*, 1994).

Estudos comparando ciclistas com indivíduos sedentários submetidos a uma sessão de exercício mostram que há um aumento maior de células "Natural Killer" (NK) durante exercício de alta intensidade nos indivíduos

treinados (PEDERSEN *et al.*, 1989; TVEDE *et al.*, 1991). Mas em estudos longitudinais (com pelo menos 16 semanas de treinamento) não se observa qualquer efeito do treinamento moderado sobre as células “Natural killer” (NK) (NIEMAN *et al.*, 1993). Apesar da contradição entre muitos estudos, Pedersen *et al.* (1998) mostram uma redução na incidência de Infecções do Trato Respiratório Superior (ITRS) em decorrência do Treinamento Moderado, como podemos observar na Fig. 2.1.

Fig. 2.1 – Modelo de susceptibilidade a infecção.

2.4 Macrófagos, Envelhecimento e Exercício

Com relação às células do Sistema Imunológico Inato, o exercício físico é capaz de alterar a resposta funcional de macrófagos por diversos mecanismos, como: elevação dos hormônios neuroendócrinos (induzida pelo exercício) (Woods *et al.*, 2000); danos no tecido muscular que resultam

numa resposta de fase aguda (iniciada pela infiltração de células inflamatórias) (Northoff *et al.*, 1995); elevação da temperatura corporal (Brenner *et al.*, 1995), alteração na disponibilidade de fontes energéticas (Parry-Billings *et al.*, 1990) e alterações na produção e sensibilidade de moléculas regulatórias, como as prostaglandinas do tipo E₂ (PG E₂) (MAHAN e YOUNG, 1989).

Agudamente, o exercício moderado ou exaustivo pode modular várias funções dos macrófagos, tanto em animais jovens como envelhecidos, como podemos observar no Quadro 2.4.

Já ao considerarmos a prática do exercício crônico, poucos estudos investigam seus efeitos sobre a função e o metabolismo dos macrófagos, provavelmente porque o exercício pode levar a diferenças fenotípicas e funcionais nas populações de macrófagos (WOODS *et al.*, 2000).

Dessa forma, fica claro a necessidade de se conhecer o funcionamento dos macrófagos no processo de envelhecimento, e também o impacto que o treinamento moderado pode ter sobre suas funções. Com isso, provavelmente alguns aspectos do envelhecimento poderão ser contornados, e o exercício poderá contribuir ainda mais como terapia diferenciada para a promoção da qualidade e da expectativa de vida dos idosos.

Quadro 2.4 - Efeito de alguns protocolos de exercício agudo sobre a função de macrófagos .

Função	Protocolo	Resultados
Quimiotaxia	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Macrófagos peritoneais, ✕ Camundongos e Porquinhos da índia, ✕ Nataação Exhaustiva. 	↑ Grupo Exercitado x Controle. ↑ Grupo Envelhecido x Jovem.
	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Macrófagos peritoneais, ✕ Camundongos e Porquinhos da índia, ✕ Nataação Exhaustiva. 	↑ Imediatamente e 24 horas após exercício.
	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Camundongos Envelhecidos, ✕ Nataação Exhaustiva. 	Sem alterações
Fagocitose	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Macrófagos peritoneais, ✕ Camundongos, ✕ Nataação Exhaustiva. 	↑ pós exercício.
	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Macrófagos peritoneais, ✕ Camundongos, ✕ Esteira. 	↑ Fagocitose e Atividade enzimática: Exercício exaustivo > Exercício Moderado > Controle.
	<ul style="list-style-type: none"> ✕ Macrófagos dos Tecidos Conectivos Humanos, ✕ Antes e Após 15 Km de corrida. 	↑ Fagocitose e Atividade enzimática pós-exercício x pré-exercício.

Legenda: ↔ Igual; ↑ Aumento; ↓ Redução; > maior que.

(Adaptado de WOODS *et al.*, 2000)

3 OBJETIVO

Como vimos:

- ✖ No envelhecimento encontramos uma diminuição da resposta imunológica que, como consequência, aumenta a incidência de infecções, doenças auto-imunes e câncer;
- ✖ Dentre as células que sofrem profundas modificações com o envelhecimento, encontramos o macrófago, que possui papel fundamental na resposta imunológica;
- ✖ O exercício moderado possui uma ação positiva sobre a resposta imunológica, atuando também diretamente na resposta de macrófagos.

Assim, podemos considerar viável que a prática regular de atividade física moderada possa reverter alterações metabólicas e funcionais em macrófagos obtidos de ratos envelhecidos, contribuindo, então, para uma melhoria na qualidade de vida dos idosos.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o papel que o treinamento moderado exerce sobre os macrófagos de ratos envelhecidos.

Para tanto, foram avaliados a capacidade funcional e o metabolismo de macrófagos obtidos de ratos envelhecidos e submetidos ao treinamento moderado em natação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 122 ratos Wistar, machos, mantidos em biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com início do período claro às 7:00 horas, temperatura ambiente 22 ± 2 °C e umidade relativa a 60%, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento no Instituto de Ciências Biomédicas - USP. Todos os animais receberam ração *Nuvilab CR1* (Nuvital ®) e água *ad libitum*.

4.1.1 *Sacrifício*

O sacrifício dos animais foi realizado por decapitação sem anestesia, sempre no período entre 10:00 e 12:00 horas, e após 24 horas do término da última sessão de exercício (para os animais treinados). Para manter o mesmo estado metabólico nos animais, estes permaneceram 4 horas em jejum antes do sacrifício.

4.1.2 *Comitê de Ética*

Este projeto foi aprovado em 16 de abril de 2001, *pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB – USP*, protocolo 027 / 2001, segundo os Princípios Éticos adotado pelo *Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)*.

4.1.3 Descrição dos Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais:

4.1.3.1 ADULTOS (AD)

Ratos com idade entre 2 a 4 meses.

4.1.3.2 ENVELHECIDOS (EV)

Ratos com idade entre 15 a 18 meses (GOMMERS *et al.*, 1983; MILLER e NADON, 2000; PLACKET *et al.*, 2004).

4.1.3.3 ENVELHECIDOS-TREINADOS (EV-TR)

Ratos com idade entre 15 a 18 meses, submetidos ao treinamento moderado em natação por 6 semanas.

4.2 Protocolo de Treinamento Aeróbio em Natação

O Treinamento foi realizado em Sistema de Natação para ratos, desenvolvido por Viera *et al.* (1988), constituído por tanques individuais, com água circulante a uma temperatura constante de 32 °C (± 2 °C).

O Protocolo de treinamento aeróbio em natação foi primeiramente descrito por Lancha Junior (1993) e posteriormente adaptado para ratos envelhecidos por MENEGUELLO (2000).

Durante 6 semanas, os animais foram treinados por no máximo 1 hora, 5 dias por semana. A intensidade do exercício foi determinada pelo acréscimo de peso equivalente a, no máximo, 2% do peso corporal do

animal, sendo este peso extra, atado a cauda e corrigido semanalmente de acordo com a variação do peso (Anexo 01).

Nas primeiras semanas os animais foram adaptados ao meio líquido, e posteriormente, houve o acréscimo progressivo da sobrecarga e do tempo total de treinamento, como ilustrado no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 – Representação esquemática do Protocolo de Treinamento Moderado em Natação.

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

Legenda: tempo = minuto (m); sobrecarga = porcentagem (%) do peso corporal.

4.3 Descrição dos Procedimentos Experimentais

Imediatamente após o sacrifício, o músculo sóleo foi retirado, congelado em gelo seco e posteriormente armazenado em freezer - 80 °C. Os macrófagos residentes da cavidade peritoneal foram retirados, mantidos no gelo e utilizados no mesmo dia para os experimentos de: quimiotaxia; aderência; fagocitose; produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂); produção de óxido nítrico (NO⁻); descarboxilação de glicose e glutamina; consumo e produção de substratos; e congelados em freezer -80 °C, para

posterior determinação da atividade máxima das enzimas *hexoquinase* e *glutaminase fosfato dependente*.

No Quadro 4.2 encontram-se esquematizadas as determinações realizadas neste estudo.

Quadro 4.2 – Divisão dos experimentos.

Objetivo	Determinações
Avaliação do treinamento moderado em natação	<ul style="list-style-type: none"> × Determinação da atividade máxima da enzima <i>Citrato Sintase</i> do Músculo Sóleo.
Caracterização dos aspectos funcionais de macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> × Aderência × Quimiotaxia × Fagocitose × Produção de H₂O₂ e Produção de NO⁻
Caracterização dos aspectos metabólicos de macrófagos	<ul style="list-style-type: none"> × Incubação: Consumo e produção de substratos × Descarboxilação de Glicose e Glutamina × Determinação da atividade máxima enzimática: <i>Hexoquinase</i> e <i>Glutaminase</i>

4.3.1 *Citrato Sintase (E.C. 4.1.3.7)*

Para a dosagem da atividade máxima da enzima *Citrato Sintase* (CS) utilizou-se o músculo Sóleo previamente descongelado, que foi homogeneizado na proporção 1:10 em tampão de extração, constituído de 50 mM tris-aminometano e 1 mM EDTA, em pH 7,4. Posteriormente este homogeneizado foi centrifugado a 16.000 x g por 1 minuto e do sobrenadante, uma alíquota foi separada para a dosagem de proteínas totais e 50 µl utilizados para a dosagem enzimática.

A atividade máxima da enzima *Citrato Sintase* (CS) foi determinada segundo protocolo modificado de Alp *et al.* (1976), a partir da quantificação do complexo amarelo formado entre a CoA liberada na reação (1) com o DTNB presente no tampão de ensaio:

O tampão de ensaio (900 µl para cada amostra) foi constituído por tris-aminometano 50 mM; EDTA 1 mM; DTNB 0,2 mM; acetil-CoA 0,1 mM e triton X-100 1% (v/v), em pH 8,1.

A reação foi iniciada pela adição de 50 µl de oxaloacetato 1 mM ao meio de ensaio, e a leitura realizada em espectrofotômetro a 25 °C e 412 nm.

Os resultados foram expressos em nmol / minuto x mg proteína⁻¹.

4.3.2 Obtenção dos Macrófagos Peritoneais

Os macrófagos residentes foram obtidos da cavidade peritoneal, após a decapitação dos animais, segundo método descrito por Costa Rosa *et al.* (1993). Posterior à assepsia com etanol 70 % (v/v), a pele da região abdominal foi removida e 10 ml de PBS sem cálcio, pH 7,4, foram injetados na cavidade peritoneal para, em seguida, ser aspirado com o auxílio de pipeta *Pasteur* de plástico. A suspensão retirada, contendo PBS e macrófagos, foi centrifugada a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C; o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 µl de PBS.

Uma alíquota desta suspensão foi utilizada para contagem total das células e para a determinação da viabilidade celular, realizada com azul de *Trypan* (1:1, v/v), e avaliada em microscópio de luz com o auxílio da Câmara de *Neubauer*.

As amostras utilizadas continham células com viabilidade superior a 98%.

4.3.3 Aderência

Após a coleta, os macrófagos foram manipulados no fluxo laminar estéril e ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 estéril, sendo novamente centrifugados a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após esta última centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 µl de meio RPMI 1640, do qual retirou-se uma alíquota para a contagem de células.

O equivalente a 1×10^6 células foram semeadas em placas de 24 poços (*Corning*) tendo ao fundo de cada poço uma lamínula circular de vidro (*Glasstecnica*, 00 X 13). Para o cultivo, a 37 °C, sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar, utilizou-se o meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg / ml e penicilina 2,5 U / ml) e glutamina 2 mM.

Após 1 hora, as lamínulas foram retiradas, lavadas com PBS, fixadas com Metanol 70% (v/v) e coradas com Hematoxilina de *Harris*. As células

aderentes foram contadas com o auxílio de um retículo milimetrado (10 x 10, 1 mm) adaptado a ocular do microscópio óptico, com a objetiva fixada no aumento equivalente a 40 vezes.

Os resultados correspondem à média obtida pela contagem das células aderidas a laminula, em 5 campos do retículo, escolhidos aleatoriamente.

4.3.4 Quimiotaxia

Para o ensaio de quimiotaxia *in vitro* foram utilizadas placas de 24 poços com 2 compartimentos (*Transwel chamber - Corning*). Cada poço possuía dois compartimentos (um inferior e outro superior), separados por uma membrana de policarbonato com poros 5,0 µm de tamanho.

Após a coleta, os macrófagos foram manipulados no fluxo laminar estéril e ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 estéril, sendo novamente centrifugados a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 µl de meio RPMI 1640, do qual retirou-se uma alíquota para a contagem de células.

Nas placas *Transwell*, no compartimento inferior, foi adicionado 300 µl da substância atraente, f-MLP a 10^{-7} M em meio RPMI 1640 contendo: antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg/ml e penicilina 2,5 U/ml) e glutamina 2 mM. No compartimento superior, adicionou-se 50 µl de meio contendo 5×10^4

células, que foram incubadas a 37°C, em estufa sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar.

Após 1 hora, a membrana foi retirada, lavada com PBS, fixada com Metanol 70% (v/v) e corada com hematoxilina de *Harris*. As células que migraram para a porção inferior da membrana foram contadas com o auxílio de um retículo milimetrado (10 x 10, 1 mm) adaptado a ocular do microscópio óptico, com a objetiva fixada no aumento equivalente a 40 vezes.

Os resultados correspondem à média obtida pela contagem das células aderidas a membrana (que realizaram quimiotaxia), em 5 campos do retículo, escolhidos aleatoriamente.

4.3.5 Fagocitose

Inicialmente, para a avaliação da capacidade fagocitária, fez-se necessário a obtenção de zimozan opsonizado para aumentar o reconhecimento pelos macrófagos (COSTA ROSA et al., 1993).

A suspensão inicial de zimozan continha 250 g de *Saccharomyces cerevisiae* dissolvidos em 100 ml de solução salina 0,9% (p/v), 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, para finalmente obter a solução utilizada na incubação.

As incubações foram realizadas em frascos de vidro previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona, v/v) e posteriormente lavados com água destilada. Os macrófagos foram incubados a 37 °C, sob agitação, para volume final igual a 1×10^6 células em 1 ml de meio de incubação. O meio de incubação foi composto (para volume final): PBS com cálcio, BSA 2% (v/v), glicose 5 mM, glutamina 2 mM e partículas de zimosan opsonizadas na concentração de 1×10^7 como descrito por COSTA ROSA *et al.* (1993).

Após 1 hora, uma alíquota do meio foi retirada para a realização da contagem de células, avaliada em microscópio de luz, após a adição do corante azul de *Trypan*, na proporção 1:1 (v/v), com auxílio da Câmara de *Neubauer*. Para a determinação da porcentagem de fagocitose, foram considerados apenas os macrófagos que englobaram 3 ou mais partículas.

4.3.6 Produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi medida utilizando-se o método descrito por Pick e Mizel (1981) modificado.

As incubações foram realizadas em frascos de vidro previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona, v/v) e posteriormente lavados com água destilada. Os macrófagos foram incubados a 37 °C, com agitação, para volume final igual a 1×10^6 células em 1 ml de meio de incubação. O meio de incubação foi composto (para volume final): PBS com cálcio, BSA 2% (v/v), glicose 5 mM, glutamina 2 mM, fenol vermelho 0,56 mM, 10 μ l PMA (100 μ g / ml PBS) e 100 μ l *Peroxidase* (1 mg / 2ml PBS).

A formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi interrompida após 1 hora de incubação com a adição de 20 μ l de NaOH 1N, e após 15 minutos, o total produzido foi quantificado em espectrofotômetro a 620 nm.

Os resultados foram expressos em nmol / 1 hora x mg proteína⁻¹.

4.3.7 Produção de Óxido Nítrico (NO^-)

Após a coleta, os macrófagos foram manipulados no fluxo laminar estéril e ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 estéril, sendo novamente centrifugados a 250 x g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 500 μ l de meio RPMI 1640, do qual retirou-se uma alíquota para a contagem de células. O equivalente a 1×10^6

células foram semeadas em placas de 24 poços (*Corning*) e incubadas previamente por 2 horas a 37 °C, sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar.

Após este período, os poços foram lavados por duas vezes com meio RPMI 1640 para a retirada das células não aderidas. Seqüencialmente, as células aderidas foram cultivadas por 24 horas (Petrevich e Alves, 2000), a 37 °C, sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar, em 1ml de meio RPMI 1640 contendo (para concentração final): 10% de soro fetal bovino (v/v), antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg / ml e penicilina 2,5 U / ml), glutamina 2 mM e LPS 10 µg / ml.

A concentração de óxido nítrico (NO[·]) foi medida indiretamente utilizando o protocolo descrito por Ding *et al.* (1988), que se baseia na reação de *Griess*, no qual o conteúdo de nitrito (NO₂⁻) medido reflete a produção de óxido nítrico (NO[·]) pelos macrófagos (Green, *et al.*, 1982). Para a determinação do óxido nítrico (NO[·]), 50 µl do sobrenadante da cultura de macrófagos foi incubado por 10 minutos (a temperatura ambiente) na presença de 50 µl da solução de *Griess*, constituída pela mistura 1:1 (v/v) das soluções: sulfanilamida 0,1 M e ácido orto-fosfórico 30% (v/v); e enediamina 7,7 mM e ácido orto-fosfórico 60% (v/v). O conteúdo de nitrito foi determinado utilizando-se uma curva de nitrito de sódio (NaNO₂) como padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 540 nm.

Os resultados foram expressos em µM.

4.3.8 Consumo e produção de substratos

A determinação do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato, glutamato e aspartato foram realizadas após a incubação de 1×10^6 células em 1 ml de meio de incubação composto por (para concentração final): PBS com cálcio, BSA 2% (v/v) e 100 μ l de substrato, 5 mM de Glicose ou 2 mM de Glutamina.

As incubações foram realizadas em frascos de vidro previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona, v/v) e posteriormente lavados com água destilada. Após 1 hora, a 37 °C, em *banho-maria* com agitação, a incubação foi finalizada com a adição de 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 25% (v/v), e o meio de incubação foi centrifugado a 16.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi coletado e neutralizado com solução TRIS/KOH 0,5M.

Todas as amostras foram congeladas a -80 °C para posteriores determinações e os substratos foram determinados a partir de 100 μ l do sobrenadante neutralizado. Os resultados foram expressos em nmol / 1 hora / mg de proteína⁻¹.

4.3.8.1 GLICOSE

O conteúdo de glicose presente no meio de incubação foi determinado através do Kit enzimático Labtest (*hexoquinase* e *glicose 6 fosfato desidrogenase*, *G6PDh*). Neste processo há produção de NADPH, que

é proporcional a concentração de glicose da amostra, segundo a reação (2):

Após incubação de 40 minutos a 37 °C, mediu-se a absorbância a 340 nm.

4.3.8.2 LACTATO

O conteúdo de lactato presente no meio de incubação foi determinado segundo o método descrito por Engle e 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 na reação (3):

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, em pH 8,85. O hidrato de hidrazina foi utilizado para impedir a reversão da reação, formando novamente o lactato. A reação foi iniciada com a adição da enzima *lactato desidrogenase (LDh)* (100 mg /ml), e após 1 hora em temperatura ambiente, determinou-se a absorbância a 340 nm.

4.3.8.3 GLUTAMINA

O conteúdo de glutamina presente no meio de incubação foi determinado segundo método descrito por Cooney *et al.* (1971) e Kirsten *et al.* (1963), que utiliza as enzimas *asparaginase* e *glutamato desidrogenase* (*GDh*). Neste método há consumo de NADH proporcional a concentração de glutamina, segundo as reações (4) e (5):

O meio utilizado foi composto por KH_2PO_4 50 mM, glicerol a 50% (v/v), NADH 4 mM, BSA 10% (v/v), *glutamato desidrogenase* 5 U/ml, α -cetoglutarato 4 M, e *asparaginase* 5 U/ml. A absorbância foi medida a 340 nm após 1 hora de incubação a temperatura ambiente.

4.3.8.4 GLUTAMATO

O conteúdo de glutamato presente no meio de incubação foi determinado segundo método descrito por Bernt e 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 presente na amostra, como na reação (6):

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

4.3.8.5 ASPARTATO

O conteúdo de aspartato presente no meio de incubação foi determinado segundo método indireto descrito por Bergmeyer *et al.* (1974).

Este protocolo 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* (GOT), como na reação (7):

Na segunda parte, há produção de malato e NAD a partir do oxaloacetato (OAA) e NADH, através da reação catalisada pela enzima *malato desidrogenase* (MDh). O consumo de NADH é proporcional à quantidade de oxaloacetato (OAA) formado, que conseqüentemente corresponde à concentração de aspartato na amostra, segundo a reação (8):

O meio de ensaio foi composto por K_2HPO_4 63 mM, KH_2PO_4 63 mM, α -cetoglutarato 3 mM, NADH 0,08 mM e *malato desidrogenase (MDh)* 6 U/ml, em pH 7,5. A reação foi iniciada após a adição da enzima *transaminase glutâmica oxaloacética (GOT)*, 4 U/ml. A absorbância foi medida a 340 nm, após 1 hora de incubação a temperatura ambiente.

4.3.9 Descarboxilação de glicose e glutamina

A descarboxilação foi avaliada após a incubação de 1×10^6 células em 1 ml de meio de incubação, composto por (para concentração final): PBS com cálcio, BSA 2% (v/v), 0,5 μ Ci de $[U-^{14}C]$ -glicose (em 5 mM de glicose) ou 0,2 μ Ci de $[U-^{14}C]$ -glutamina (em 2 mM de glutamina), conforme descrito por KOWALCHUCK *et al.* (1988).

Os macrófagos foram incubados com os substratos marcados, a 37°C, sob agitação, em *erlenmeyers* de 25 ml. Os *erlenmeyers* possuíam reservatório interno para a mistura de adsorção, e foram previamente siliconizados (silicone a 1% em acetona, v/v), lavados com água destilada.

Após 1 hora, a incubação foi interrompida pela adição de 200 μ l de ácido tricloroacético (TCA) 25% (v/v), e no reservatório interno, adicionou-se 1 ml de mistura de adsorção formada por 2-feniletilamina e metanol (1:1, v/v). Os frascos foram mantidos em banho-maria sob agitação por mais uma hora para que o CO_2 liberado durante a primeira incubação fosse adsorvido pela mistura do compartimento interno do frasco.

A mistura, retirada do reservatório interno, foi acrescida da solução de cintilação EcoLume, e a radiação determinada em CPM (contagem por minuto).

Os resultados foram expressos em nmol / 1 hora / mg de proteína⁻¹.

4.3.10 Hexoquinase (E.C. 2.7.1.1)

A enzima *Hexoquinase* (HK) catalisa a reação de fosforilação da glicose formando Glicose-6-Fosfato (G-6-P), sendo a primeira enzima da via glicolítica. Sua atividade máxima foi determinada pelo método descrito por Crabtree e Newsholme (1972) modificado, e se baseia na formação de NADPH através da enzima *Glicose-6-Fosfato Desidrogenase* (*G6PDh*), na reação (9):

As células, previamente descongeladas, foram sonicadas e 20 µl incubados em meio de ensaio (930 µl por amostra) constituído por: Tris-HCl 75 mM, EDTA 0,8 mM; KCl 1,5 mM; Mercaptoetanol 4 mM; NADP 0,4 mM; ATP 2,5 mM; creatina fosfato 10 mM; *creatina quinase* 1,8 U; *glicose 6 fosfato desidrogenase* (*G6PDh*) 1,4 U; triton X-100 0.05% (v/v), em pH 7,5. A reação iniciou-se com a adição de glicose ao meio (50µl) e as determinações foram realizadas a 37 °C em 340 nm.

Os resultados foram expressos em nmol / minuto / mg proteína⁻¹.

4.3.11 *Glutaminase fosfato-dependente* (E.C. 3.5.1.2.)

Determinou-se a atividade máxima da enzima *glutaminase fosfato-dependente* através do método indireto descrito por Curthoys e Lowry (1973), baseado no princípio de que esta enzima chave da Glutaminólise é responsável pela formação de Glutamato, na reação (10):

As células, previamente descongeladas, foram coletadas em PBS sem cálcio, sonicadas e 100 µl incubados por 10 minutos a 37 °C em meio de ensaio (800 µl por amostra), formado por: tampão fosfato 50 mM (mistura equimolar de KH₂PO₄ e K₂HPO₄), tampão Tris/EDTA (Tris-HCl 50 mM e EDTA 0,2 mM) e triton X-100 0,05% (v/v), pH 8,6. O início da reação se deu com a adição de 100 µl de glutamina 20 mM, e terminou com 200 µl de TCA 25% (v/v).

Após a incubação, as células foram centrifugadas a 16.000 x g, por 3 minutos, e somente o sobrenadante foi coletado e neutralizado com soluções de KOH 0,5 M e Tris/KOH 2 M. Todas as amostras foram congeladas em - 80° C, para posterior dosagem de glutamato (como descrito anteriormente no item 4.3.8.4 (p. 42).

Os resultados foram expressos em nmol / minuto / mg proteína⁻¹.

4.3.12 Determinação do conteúdo de Proteína das amostras

Utilizou-se a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951) para os homogeneizados de tecidos e amostras celulares. O princípio consiste na hidrólise alcalina das proteínas celulares com posterior reação com o reagente colorimétrico de *Folin-Ciocalteu*, em solução contendo Na_2CO_3 200 mM, NaOH 100 mM, tartarato de sódio e potássio 1 mM e sulfato de cobre 20 mM. A leitura foi realizada a 750 nm e os valores obtidos foram comparados a curva padrão de albumina.

4.3.13 Soluções

A composição do PBS sem Cálcio, usado para a coleta dos macrófagos, consistiu na mistura de NaCl 0,12 mM; Na_2HPO_4 anidro 10 mM e KH_2PO_4 anidro 3,2 mM em água destilada, pH 7,4 a 25 °C .

O PBS com Cálcio, usado nas incubações, consistiu na mistura de NaCl 0,14 M; KCl 4,7 mM; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; Na_2HPO_4 4 mM e NaH_2PO_4 1,3 mM em água destilada, pH 7,4 a 25 °C. Posteriormente a dissolução dos sais, foi adicionado $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ para 1,3mM.

Para a contagem das células utilizou-se o corante azul de *Trypan* a 1% em PBS sem cálcio. Para os ensaios de aderência e quimiotaxia utilizou-se o corante hematoxilina de *Harris*, composto por 2,5 g de hematoxilina, 50 g de sulfato de alumínio e amônia, 25 ml de etanol, 500 ml de H_2O e 1 g de óxido de mercúrio.

4.3.14 Equipamentos

Para a realização das determinações utilizaram-se os equipamentos listados no Quadro 4.3:

Quadro 4.3 – Equipamentos utilizados.

Equipamento	Marca	Modelo
Centrífuga	Hettich	35 R
Centrífuga	Jouan	MR 22
Microscópio óptico	Nikon	Alphaphot-2 YS2
Sonicador	VirTis	VirSonic 100
Espectrofotômetro	Hitachi	U-2001
Espectrofotômetro	Beckman	DU 640
Contador de cintilação	Packard	Tri-carb 2100TR
Elisa	Molecular Devices	Spectra Max Plus
Freezer – 80 °C	Forma Scientific	Vip series – 86 °C
Estufa	Sanyo	Model 3110
Homogeneizador	Bosch	GG5 27L 27000 RPM

4.3.15 Reagentes

Para a realização das determinações utilizaram-se os reagentes listados no Anexo 02.

4.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio da estatística *Cleide Rosana Duarte Prisco*, Depto. de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

Os resultados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste de 'Tukey', e 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 amostras (n) para cada grupo avaliado. A seqüência de apresentação dos resultados obedece à ordem estabelecida no quadro 4.2 (p. 32).

5.1 Avaliação do Treinamento Moderado em Natação

Para avaliar a eficácia do programa de treinamento aeróbio em natação, foi avaliada a atividade máxima da enzima *Citrato sintase* no músculo sóleo dos animais estudados (HENRIKSSON, 1992; KRIKETOS *et al*, 1995).

Houve um aumento equivalente a 47% na atividade da *Citrato sintase* nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $106,8 \pm 14,5$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹) em relação aos animais Envelhecidos (EV: $72,5 \pm 2,0$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹) e Adultos (AD: $72,8 \pm 4,1$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹), como ilustrado na Tabela/Gráfico 5.1.

5.2 Caracterização dos Aspectos Funcionais de Macrófagos

Para se estudar a capacidade funcional dos macrófagos obtidos da cavidade peritoneal, foram avaliadas as capacidades de: aderência, quimiotaxia, fagocitose e a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Óxido Nítrico (NO⁻).

Tabela/Gráfico 5.1 - Atividade máxima da enzima *Citrato Sintase* no músculo sóleo dos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em nmol / minuto x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

<i>CITRATO SINTASE</i> (nmol / minuto x mg de proteína ⁻¹)	
AD	72,8 ± 4,1 (7)
EV	72,5 ± 2,0 (8)
EV-TR	106,8 ± 14,5 (7) * #

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

* p < 0,05 em comparação aos animais ADULTOS (AD).

p < 0,05 em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV).

Na Tabela/Gráfico 5.2, pode-se observar um aumento equivalente a 2,3 vezes na capacidade de aderência dos macrófagos dos animais Envelhecidos-Treinado (EV-TR: $83,1 \pm 12,0$) em comparação aos animais Adultos (AD: $36,7 \pm 8,2$).

A avaliação da capacidade em realizar quimiotaxia mostrou-se elevada nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $129,2 \pm 13,1$), sendo este aumento equivalente a 3,7 vezes em relação aos animais Adultos (AD: $35,3 \pm 4,3$), e 2,4 vezes em relação aos animais Envelhecidos (EV: $53,9 \pm 13,7$)(Tabela/Gráfico 5.2).

Na avaliação da capacidade de fagocitose de partículas de zimozan opsonizadas não foi observada diferença entre os grupos estudados, Adultos (AD: $55,0 \pm 10,5$ %), Envelhecidos (EV: $42,9 \pm 3,6$ %) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $49,2 \pm 3,2$ %), como ilustrado na Tabela/Gráfico 5.2.

Quanto à produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos estimulados com PMA, observamos um aumento da ordem de 3,5 vezes nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $56,3 \pm 7,5$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), em relação aos animais Adultos (AD: $15,9 \pm 2,2$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos (EV: $16,9 \pm 2,5$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) (Tabela/Gráfico 5.3).

Tabela/Gráfico 5.2 - Capacidade de **Aderência, Quimiotaxia e Fagocitose** de macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal dos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em número de células e porcentagem $\pm$ EPM (n).

	ADERÊNCIA (número de células)	QUIMIOTAXIA (número de células)	FAGOCITOSE (%)
AD	36,7 $\pm$ 8,2 (5)	35,3 $\pm$ 4,3 (7)	55,0 $\pm$ 10,5 (5)
EV	45,8 $\pm$ 10,1 (6)	53,9 $\pm$ 13,7 (7)	42,9 $\pm$ 3,6 (9)
EV-TR	83,1 $\pm$ 12,0 (6) *	129,2 $\pm$ 13,1 (7) * #	49,2 $\pm$ 3,2 (6)

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

* $p < 0,05$ em comparação aos animais ADULTOS (AD).

$p < 0,05$ em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV).

Tabela/Gráfico 5.3 - Produção de **Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)** e **Óxido nítrico (NO⁻)** por macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal dos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ e μM ± EPM (n).

	H₂O₂ (nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)	NO⁻ (μM)
AD	15,9 ± 2,2 (4)	43,8 ± 4,3 (6)
EV	16,9 ± 2,5 (7)	41,6 ± 6,2 (6)
EV-TR	56,3 ± 7,5 (5) * #	76,7 ± 12,6 (7) #

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

* p < 0,05 em comparação aos animais ADULTOS (AD).

p < 0,05 em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV).

Com relação à produção de Óxido Nítrico ($\text{NO}^\cdot$) por macrófagos cultivados na presença de LPS, observou-se um aumento equivalente a 84% nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $76,7 \pm 12,6 \mu\text{M}$) comparados aos animais Envelhecidos (EV: $41,6 \pm 6,2 \mu\text{M}$) (Tabela/Gráfico 5.3).

5.3 Caracterização do Metabolismo de Macrófagos

Para caracterizar os aspectos metabólicos dos macrófagos obtidos da cavidade peritoneal, foram avaliadas a produção de lactato, glutamato e aspartato, para determinar as vias de utilização da glicose e glutamina; a capacidade de descarboxilação dos substratos glicose e glutamina, e a atividade máxima das enzimas *Hexoquinase* e *Glutaminase fosfato dependente*, indicativas da capacidade de utilização de glicose e da via glutaminolítica, respectivamente.

Nas incubações celulares realizadas na presença de glicose, observamos um aumento no consumo de glicose nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $5,28 \pm 0,48 \text{ nmol} / 1 \text{ hora} \times \text{mg de proteína}^{-1}$), equivalente a 2,5 vezes em relação aos animais Envelhecidos (EV: $2,10 \pm 0,67 \text{ nmol} / 1 \text{ hora} \times \text{mg de proteína}^{-1}$) (Tabela/Gráfico 5.4).

Tabela/Gráfico 5.4 - Consumo de glicose e Produção de lactato por macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal, incubados por 1 hora na presença de 5 mM de glicose, nos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO DE GLICOSE	PRODUÇÃO DE LACTATO
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)	
AD	4,01 ± 0,51 (3)	24,33 ± 5,67 (5)
EV	2,10 ± 0,67 (8)	20,88 ± 3,44 (8)
EV-TR	5,28 ± 0,48 (8) [#]	11,47 ± 1,23 (12) [*]

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

* p < 0,05 em comparação aos animais ADULTOS (AD).

[#] p < 0,05 em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV).

Já na produção de lactato, observamos uma redução da ordem de 53% nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $11,47 \pm 1,23$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) quando comparados aos animais Adultos (AD: $24,33 \pm 5,67$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) (Tabela/Gráfico 5.4).

Na presença de glutamina, nos ensaios de incubação de células, não encontramos diferença quanto ao consumo de glutamina -Adultos (AD: $1,40 \pm 0,35$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), Envelhecidos (EV: $0,97 \pm 0,21$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $0,43 \pm 0,08$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹); produção de glutamato - Adultos (AD: $4,28 \pm 1,13$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), Envelhecidos (EV: $2,97 \pm 1,14$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $1,54 \pm 0,42$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹); e produção de aspartato - Adultos (AD: $2,87 \pm 1,53$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), Envelhecidos (EV: $8,03 \pm 1,53$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $8,64 \pm 1,93$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), como ilustrado na Tabela/Gráfico 5.5.

Tabela/Gráfico 5.5 - Consumo de glutamina, Produção de glutamato e aspartato por macrófagos residentes da cavidade peritoneal incubados por 1 hora na presença de 2 mM de glutamina, nos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	CONSUMO DE GLUTAMINA	PRODUÇÃO DE GLUTAMATO	PRODUÇÃO DE ASPARTATO
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)		
AD	1,40 ± 0,35 (7)	4,28 ± 1,13 (5)	2,87 ± 1,53 (5)
EV	0,97 ± 0,21 (5)	2,97 ± 1,14 (5)	8,03 ± 1,53 (6)
EV-TR	0,43 ± 0,08 (6)	1,54 ± 0,42 (5)	8,64 ± 1,93 (4)

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

Nos experimentos realizados para a verificação da descarboxilação de glicose e glutamina, ilustrado na Tabela/Gráfico 5.6, não observamos diferença significativa entre os grupos avaliados; glicose – Adultos (AD: $0,37 \pm 0,08$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), Envelhecidos (EV: $0,24 \pm 0,04$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $0,34 \pm 0,07$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹); glutamina - Adultos (AD: $2,97 \pm 0,70$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹), Envelhecidos (EV: $2,39 \pm 0,52$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $1,69 \pm 0,17$ nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹).

Complementando as avaliações metabólicas realizadas nos macrófagos peritoneais dos grupos estudados, verificamos a atividade máxima das enzimas *hexoquinase* e *glutaminase fosfato dependente*. Observamos uma redução de 72% na atividade da enzima *hexoquinase* nos animais Envelhecidos (EV: $5,22 \pm 0,85$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹), quando comparados aos animais Adultos (AD: $18,40 \pm 2,82$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹) (Tabela/Gráfico 5.7). Nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $18,02 \pm 3,06$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹) houve um aumento da atividade da *hexoquinase* equivalente a 3,4 vezes em relação aos animais Envelhecidos (EV) (Tabela/Gráfico 5.7).

Tabela/Gráfico 5.6 - Descarboxilação de macrófagos residentes obtidos da cavidade peritoneal incubados por 1 hora na presença de 0,5 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Glicose em 5 mM de glicose, ou 0,2 μCi de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -Glutamina em 2 mM de glutamina, dos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em $\text{nmol} / 1 \text{ hora} \times \text{mg de proteína}^{-1} \pm \text{EPM} (n)$.

	GLICOSE	GLUTAMINA
	(nmol / 1 hora x mg de proteína ⁻¹)	
AD	0,37 $\pm$ 0,08 (9)	2,97 $\pm$ 0,70 (5)
EV	0,24 $\pm$ 0,04 (10)	2,39 $\pm$ 0,52 (7)
EV-TR	0,34 $\pm$ 0,07 (8)	1,69 $\pm$ 0,17 (6)

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

Tabela/Gráfico 5.7 - Atividade máxima das enzimas *Hexoquinase* e *Glutaminase fosfato dependente* de macrófagos residentes da cavidade peritoneal dos animais Adultos (AD), Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Os dados correspondem à média em nmol / 1 hora x mg de proteína⁻¹ ± EPM (n).

	<i>Hexoquinase</i>	<i>Glutaminase</i>
	(nmol / minuto x mg de proteína ⁻¹)	
AD	18,40 ± 2,82 (6)	6,70 ± 2,15 (4)
EV	5,22 ± 0,85 (7) *	3,90 ± 0,74 (7)
EV-TR	18,02 ± 3,06 (5) #	13,98 ± 2,39 (5) * #

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido pelo Teste de Tukey.

* p < 0,05 em comparação aos animais ADULTOS (AD).

p < 0,05 em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV).

A atividade máxima da enzima *Glutaminase fosfato dependente* mostrou-se elevada nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR: $13,98 \pm 2,39$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹), quando comparados aos animais Adultos (AD: $6,70 \pm 2,15$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹) e Envelhecidos (EV: $3,90 \pm 0,74$ nmol / minuto x mg de proteína⁻¹), aumento equivalente a 2,1 vezes e 3,6 vezes, respectivamente, como ilustrado na Tabela/Gráfico 5.7.

6 DISCUSSÃO

O envelhecimento, processo natural caracterizado pela “*perda da eficiência dos processos envolvidos na manutenção da homeostase do organismo*” (Green, 1994; *apud* Timiras, 1994), tem sido extensamente estudado, principalmente nos últimos anos, uma vez que se observa um aumento da população idosa mundial (ONU, 2000). Dessa forma, estudos que busquem compreender as alterações fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento, ajudam a elucidar este processo e como consequência, possibilitam uma melhor qualidade de vida para o indivíduo idoso (SPIRDUSO, 1995).

Dentre as alterações encontradas com o avanço da idade observamos a queda na eficiência de algumas funções do Sistema Imunológico, conhecida como imunosenescência, e que segundo Pawelec *et al.* (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. Clinicamente, sabe-se que a habilidade do indivíduo idoso em responder a uma infecção está diminuída quando comparada a adultos jovens, isso resulta em um aumento no número de infecções com mais severidade e com maior tempo de duração (PLACKETT *et al.*, 2004).

Inúmeros estudos são realizados para investigar as alterações promovidas pelo envelhecimento sobre o sistema imunológico adaptativo,

principalmente envolvendo os Linfócitos T. Já está bem estabelecido que com o processo de envelhecimento há redução de muitas das funções dos Linfócitos T, que prejudicam a resposta imunológica no idoso (ERNST *et al.*, 1995; HIROKAWA, 1997; MENEGUELLO, 2000; SHINKAI, 1995; SONG, 1993). Dentre estas alterações, temos a redução da capacidade proliferativa, síntese de IL-2, expressão de receptores de alta afinidade para IL-2, acúmulo de células de memória (CD45RO⁺), diminuição de células “virgens” (CD45RA⁺), redução da relação dos linfócitos Th1/Th2, entre outras (ERNST *et al.*, 1995; HIROKAWA, 1997; MENEGUELLO, 2000; WOODS *et al.*, 1999).

O sistema imunológico inato também tem suas funções diminuídas com o aumento da idade (Plackett *et al.* 2004; Plowden *et al.*, 2004), apresentando redução na capacidade de produção de ânion superóxido (O₂⁻) e óxido nítrico (NO[•]) por macrófagos e neutrófilos (Fu *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1999), diminuição da estimulação de linfócitos B pelas células dendríticas (Szakal *et al.*, 2002) e redução da capacidade citolítica das células “Natural Killer” (NK) (RAVAGLIA *et al.*, 2000; DE LA FUENTE, *et al.* 2002). Estas alterações contribuem para uma menor resposta do sistema adaptativo (Makinodan e Kay, 1980; Solana *et al.*, 1991), já que para que este último sistema possa atuar, há a necessidade da ação das células que compõe o sistema imune inato, principalmente: neutrófilos, células dendríticas, “natural killer” (NK) e macrófagos, (ABBAS, 2000; PLACKETT *et al.*, 2004).

Os macrófagos, células que trabalham como “sensores de patógenos” (Plowden *et al.*, 2004), possuem papel importante para o início dos processos

inflamatórios, eliminação de patógenos, manipulação da resposta adaptativa (seja como célula apresentadora de antígeno e/ou célula efetora) e reparo do tecido lesado (FERRANDEZ e DE LA FUENTE, 1999; LLOBERAS e CELADA, 2002; PLACKETT, *et al.*, 2004; PLOWDEN *et al.*, 2004).

O sistema imunológico, como participante do eixo neuroimunoendócrino (Besedovsky e Del Rey, 1996) pode ter sua função modulada por diversos estímulos e desafios aos demais componentes do eixo, como é o caso do exercício físico, que, sabidamente, provoca alterações neuroendócrinas (WEIGENT e BLALOCK, 1995). De fato, esta modulação vem sendo estudada, de maneira mais sistematizada, a partir da década de 80, século passado (PEDERSEN E HOFFMAN-GOETZ, 2000). Os resultados obtidos até o momento sugerem que o exercício seja capaz de modular diversos aspectos da resposta imune, como apresentado, para o exercício moderado, no Quadro 2.3 (p. 21) (HIROKAWA, 1997; MACKINNON, 1998; NIEMAN, 1997; NIEMAN *et al.*, 1994; PEDERSEN *et al.*, 1998; SHEPHARD *et al.*, 1994). Com relação ao exercício intenso, encontramos, na literatura, resultados que apontam para um efeito, preponderantemente imunossupressor, (COSTA ROSA e VAISBERG, 2004; MACKINNON, 2000; NIEMAN, 1997; PEDERSEN E HOFFMAN-GOESTZ, 2000; WOODS *et al.*, 1999).

Como ocorre com as outras células do Sistema Imune, o macrófago também sofre modificações induzidas pelo exercício (Ferrandes e De La Fuente, 1999; Meneguello, 2000; Woods *et al.*, 1999b), como aumento da capacidade fagocitária (FEHR *et al.*, 1988, MENEGUELLO, 2000). Estes

resultados, no entanto, se referem, em sua maioria, aos efeitos de uma sessão aguda, sendo poucos os relatos sobre os efeitos do treinamento sobre a resposta imune.

Por este motivo, o objetivo do nosso estudo foi verificar o efeito do exercício crônico moderado sobre os macrófagos de ratos envelhecidos, investigando suas funções e metabolismo, pois como é mostrado pela literatura, o exercício pode ser uma das estratégias utilizadas para modular a resposta imunológica em idosos, melhorando ou até mesmo revertendo o quadro de imunosenescência (HIROKAWA, 1997), em decorrência da alteração na função macrofágica, assim como outros aspectos da resposta imune adaptativa (PLACKETT, *et al.*, 2004; PLOWDEN *et al.*, 2004

Devido às inúmeras dificuldades experimentais que o trabalho com humanos impõe, amplamente listados na literatura por Shinkai *et al.* (1997), Lloberas e Celada (2002) e Woods, *et al.* (2000), decidimos avaliar as funções e metabolismo de macrófagos num modelo experimental em ratos. Dessa forma, foi possível coletar diretamente dos animais os macrófagos a serem estudados, já que em seres humanos a única possibilidade existente de se estudar estas células é indiretamente através da estimulação dos monócitos circulantes (LLOBERAS e CELADA, 2002 e WOODS, *et al.*, 2000).

Para investigar a ação do exercício sobre macrófagos de ratos envelhecidos, em nosso estudo, utilizamos animais com idade entre 15 a 18

meses considerados envelhecidos, segundo GOMMERS, *et al.* (1983); MILLER e NADON, (2000) e PLACKETT *et al.*, (2004).

6.1 Treinamento Moderado em Natação

Inicialmente, para verificar a eficácia do Protocolo do Treinamento Aeróbio (moderado) a que os nossos animais foram submetidos, avaliamos a Atividade Máxima da enzima *Citrato Sintase* no músculo sóleo. Este músculo foi escolhido pois, segundo Delp e Duan (1996), a sua composição, em ratos, é correspondente a 84% de fibras do tipo I, fibras que possuem metabolismo oxidativo, e portanto, se adaptam ao treinamento moderado, como o utilizado neste estudo.

A escolha da enzima *Citrato Sintase* se deu devido ao seu papel de entrada de carbono no ciclo de Krebs e, portanto, pela manutenção da atividade do mesmo (NEWSHOLME e LEECH, 1989). No ciclo não há acúmulo de intermediários, mudanças na atividade máxima enzimática pode ser considerada indicativo de mudança do fluxo de substratos pelo ciclo e, logo, adaptação ao treinamento (HENRIKSSON, 1992; KRIKETOS *et al*, 1995; NEWSHOLME e LEECH, 1989). Assim, o aumento da atividade máxima da *Citrato Sintase* é considerado um indicador qualitativo do metabolismo oxidativo, e portanto, um indicativo da adaptação muscular ao exercício aeróbio realizado cronicamente.

Como podemos constatar em no nosso trabalho, houve um aumento da ordem de 47% na atividade máxima da enzima *Citrato Sintase* nos

animais submetidos ao treinamento aeróbio moderado, Envelhecidos-Treinados (EV-TR). Este aumento foi semelhante ao encontrado nos estudos desenvolvidos por HENRIKSSON, (1992), KRIKETOS *et al* (1995); LU *et al* (1999) e MENEGUELLO (2000). Dessa forma então, podemos confirmar a eficiência do protocolo de exercício utilizado e concluir que os animais se adaptaram ao treinamento moderado em natação, e, portanto, podemos investigar o efeito do exercício aeróbio sobre a função de macrófagos de ratos envelhecidos.

6.2 Função de Macrófagos

Para que o macrófago exerça seu papel na resposta imunológica inata e também fazer a interação deste sistema como o imunológico adaptativo, a preservação ou restauração de suas funções no processo de envelhecimento, se torna de vital importância, pois além de serem capazes de realizar a fagocitose e destruir patógenos e debris celulares, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígeno para os linfócitos (ADAMS e HAMILTON, 1984; PLACKETT *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, caracterizamos o efeito do exercício moderado aeróbio, em ratos envelhecidos, sobre algumas funções exercidas pelos macrófagos, como a aderência, quimiotaxia, fagocitose, e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO^-); e também sobre a capacidade em metabolizar glicose e glutamina.

Para efeito de comparação, realizamos as mesmas dosagens em animais adultos (2 a 4 meses), como controle das possíveis alterações promovidas pela prática do exercício no rato envelhecido.

É importante frisar que o nosso objetivo principal foi investigar o efeito do exercício crônico, por este motivo, os animais foram sacrificados 24 horas após a última sessão de treinamento, minimizando assim o efeito agudo da última sessão do exercício (PEDERSEN E HOFFMAN-GOESTZ, 2000).

Para o estudo das funções e metabolismo de macrófagos coletamos as células presentes na cavidade peritoneal. O fluido obtido do lavado peritoneal com PBS, segundo Dörger *et al.* (2001), possui cerca de 70 % de macrófagos (0,5% de neutrófilos, 20 % de eosinófilos, 1,4 % de linfócitos e 8,8 % de mastócitos). A obtenção do macrófago deste compartimento ocorreu devido ao fato das células residentes (presente nos tecidos ou cavidades) estarem em sua grande maioria em estado quiescente (sem estarem estimuladas), com baixa atividade funcional (LU *et al.*, 1999; Woods *et al.*, 2000), e exercerem o papel de “vigilantes” da cavidade peritoneal (DÖRGER *et al.*, 2001). Além disso, a obtenção dos macrófagos presentes na cavidade peritoneal, é de fácil aquisição (Woods *et al.*, 2000) e possibilitou um do número de células, por cada animal, em quantidades adequadas aos experimentos realizados (em média 2×10^7 células / ml). Outro fator determinante, foi em decorrência dos macrófagos peritoneais não estarem previamente estimulados, já que o fato dos animais serem submetidos ao treinamento em natação, portanto estarem em contato constante com a

água, possibilitaria a ativação dos macrófagos alveolares por possíveis patógenos presentes na água. A opção de utilizarmos macrófagos não previamente estimulados foi para de priorizarmos as mudanças decorrentes do próprio processo de envelhecimento (TANG *et al.*, 2000).

Inicialmente, estudamos a capacidade de aderência e quimiotaxia exercida pelos macrófagos, consideradas as duas primeiras etapas envolvidas no processo de fagocitose, segundo FORNER *et al.* (1994). O processo de aderência monócito-macrófago precede o estágio de mobilidade em direção ao foco inflamatório ou infeccioso (quimiotaxia), onde a fagocitose é finalizada (FORNER *et al.*, 1994). Esta ação é controlada por moléculas de adesão que regulam as interações célula/célula, como a molécula Mac-1 (CD 11b/CD 18) nos monócitos, ligando-se a ICAM-1 ("intercelular adhesion molecule-1") presente nas células endoteliais. Mediadores inflamatórios, incluindo LPS, IFN- γ , IL-1 e TNF α , causam forte indução da ICAM-1 em uma variedade de tecidos, aumentando a ligação com os receptores dos monócitos (Mac-1) e contribuindo para a infiltração destas células nos sítios de inflamação (AUGER e ROSS, 1992), e, portanto para a diferenciação do monócito em macrófago.

Para investigar a capacidade de adesão, incubamos os macrófagos em placas de 24 poços na presença de uma lamínula circular de vidro, que serviu como um estímulo para a aderência de macrófagos (GESSANI *et al.*, 2000). Em nosso estudo, não observamos um aumento significativo da capacidade de aderência nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em

relação aos animais Envelhecidos (EV). Quando comparamos os valores entre os animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) e Adultos (AD), como forma de verificar se o treinamento aeróbio foi capaz de restaurar a função macrofágica, observamos que houve um aumento equivalente a 2,3 vezes na aderência dos animais Envelhecidos-treinados (EV-TR), mostrando que neste caso, o exercício aumentou a capacidade de adesão dos macrófagos principalmente em relação aos valores de referência encontrados para os animais Adultos (AD).

O fato de não encontrarmos diferença significativa entre os animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) e Envelhecidos (EV) pode ser devido a grande variabilidade entre as amostras e também a baixa especificidade do estímulo aplicado ao macrófago para realizar a aderência.

A opção por não utilizarmos uma molécula ativadora de aderência (como LPS ou TNF- α) se deve ao fato, de priorizarmos a investigação das mudanças decorrentes do próprio processo de envelhecimento (Tang *et al.*, 2000); e como era nosso objetivo avaliarmos o efeito do processo do envelhecimento sobre a capacidade de resposta do macrófago, a lamínula de vidro serviu como um estímulo semelhante a uma situação inflamatória inespecífica.

Poucos são os estudos que investigam a atuação do exercício crônico sobre a capacidade de aderência, sendo a grande maioria voltada para o efeito do exercício agudo, que na maioria das vezes resulta num aumento

das funções macrofágicas, como aumento da capacidade fagocitária e da produção dos produtos derivados do oxigênio (ânion superóxido - O_2^- e peróxido de hidrogênio - H_2O_2) (ORTEGA *et al.*, 1997; SUGIURA *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados em nosso estudo são semelhantes aos encontrados por WOODS *et al.* (1995) que investigaram o efeito do exercício moderado e exaustivo sobre a capacidade antitumoral de macrófagos de camundongos adultos, que mesmo com o aumento da capacidade citotóxica, não apresentaram diferença na aderência entre os grupos avaliados. Forner *et al.* (1994) mostraram que após uma sessão de exercício, em camundongos sedentários e treinados (por 1 mês), a capacidade de aderência dos macrófagos mostrou-se reduzida em relação aos animais controles (não submetidos ao treinamento).

Provavelmente, estas diferenças também ocorrem devido ao tipo de exercício a que os animais foram submetidos e posteriormente avaliados, e também a forma em que a capacidade de aderência foi avaliada nos macrófagos. Os procedimentos utilizados nestes estudos e no nosso, são praticamente os mesmos, diferindo apenas na forma em que as células foram avaliadas, em nosso caso avaliamos as células aderidas a laminula de vidro, enquanto que em outros estudos, o índice de células aderidas é calculado pela diferença entre a quantidade de células incubadas e a quantidade de células não aderidas.

Após avaliarmos a capacidade de adesão nos macrófagos, investigamos o segundo passo do processo envolvido na fagocitose, ou seja, a sua habilidade em migrar para o local de inflamação, conhecida como quimiotaxia, imprescindível para a eficiente remoção de patógenos (ORTEGA *et al.*, 1997; PLOWDEN *et al.*, 2004). Esta migração é estimulada pelo gradiente de concentração formado por fatores quimioatrativos, como: N-formyl-peptídeos (produto bacteriano), produtos de ativação do sistema complemento (C5a), leucotrieno B₄, fator de ativação de plaquetas (PAF), e algumas quimiocinas como a IL-8, (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Em experimentos *in vitro* muito se utiliza o f-MLP (N-formyl-met-leu-phe) que é um potente agente quimioatrativo que simula a combinação de peptídeos encontrados em bactérias. Em nosso estudo, quando avaliamos a quimiotaxia encontramos um aumento equivalente a 2,4 vezes nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em relação aos animais Envelhecidos (EV). Este aumento da capacidade quimiotática representa uma forma de se aumentar a resposta imunológica, já que provavelmente diminui o tempo do processo migratório do macrófago em relação ao local da inflamação (PLOWDEN *et al.*, 2004). Na literatura, a maioria dos estudos foca a investigação da capacidade de quimiotaxia após a prática de exercício agudo, situação na qual encontramos um aumento da quimiotaxia, como no trabalho de Forner *et al.* (1994), que observou este efeito tanto em camundongos jovens e envelhecidos; e naqueles de Ortega *et al.* (1992) e Ortega *et al.* (1997). Para estes autores, o aumento da quimiotaxia ocorre em decorrência do aumento da concentração dos hormônios

imunomodulatórios, mais especificamente a corticosterona, principal glicocorticóide liberado por roedores (ORTEGA *et al.*, 1997 e FERRANDEZ e DE LA FUENTE, 1999).

Quando os animais são submetidos a um período de treinamento físico, há uma significativa redução das concentrações séricas de corticosterona, isto tanto em animais jovens como envelhecidos (Ferrandez e De La Fuente, 1999; Meneguello, 2000), e mesmo assim, Ferrandez e De la Fuente, 1999, mostram aumento da capacidade quimiotática de camundongos submetidos a 20 dias de treinamento, por 90 minutos. Provavelmente, o fato dos animais serem submetidos às sessões diárias de exercício leva a uma constante ativação dos processos envolvidos na quimiotaxia e, cronicamente, o resultado é que estas células desenvolvem uma maior sensibilidade frente aos fatores estimulatórios.

Como vimos, duas etapas estão envolvidas no processo de fagocitose, a aderência e quimiotaxia, e posteriormente são seguidas pela fagocitose, na qual os macrófagos engolfam os microorganismos formando os fagossomos, que se fundem aos lisossomos havendo assim, a liberação de uma variedade de proteases que digerem e processam as proteínas estranhas a peptídeos antigênicos (CEDDIA e WOODS, 1999). A capacidade de fagocitose exercida pelos macrófagos é de extrema importância para a resposta imunológica, pois uma vez iniciada ela resulta em 3 importantes ações, que segundo Janeway e Travers (1996), são: a degradação e eliminação total de muitos patógenos simplesmente pelo processo de

fagocitose, liberação de citocinas que estimulam a citotoxicidade das células “Natural Killers” (NK), e o processamento e apresentação de antígenos para as células do sistema imunológico adaptativo, com a ativação das células T, células B e a subsequente produção de anticorpos.

Na literatura, encontramos dados conflitantes em relação ao processo de envelhecimento e a capacidade fagocitária que se mostra aumentada nos animais envelhecidos investigados por De La Fuente (1985), Sugiura *et al.* (2000) e Utsuyama *et al.*, (1996), sem alterações, como no trabalho de Makinodan e Kay (1980), ou mesmo com atividade reduzida (COSTA ROSA *et al.*, 1993; FERRANDEZ e De LA FUENTE, 1999). Para avaliar a capacidade de fagocitose, alguns autores, como Ferrandez e De La Fuente (1999), Ortega *et al.* (2000), utilizam partículas de látex para estimulá-la em macrófagos, diferentemente da técnica que utilizamos em nosso estudo, na qual preferimos a utilização de moléculas de *zimosan* opsonizadas, com o próprio soro do rato. O fato das partículas serem previamente opsonizadas faz com que os macrófagos aumentem o reconhecimento pelas partículas de *zimosan*, em detrimento das partículas de látex. Isso porque o processo de opsonização, realizado principalmente pela molécula C3b do Sistema Complemento, proporciona um maior reconhecimento do macrófago pela partícula, devido à existência de receptores específicos para o sistema complemento CR3 (“Complemente receptor-3”) nos macrófagos (Halliwell e Gutteridge, 2000; Van Der Berg *et al.* 2001). No caso das partículas de látex,

como elas não são previamente opsonizadas, o reconhecimento pelo macrófago depende apenas dos receptores inespecíficos ("scavengers").

Acredita-se que em diferentes períodos do envelhecimento encontramos respostas diferenciadas dos macrófagos, provavelmente dependente do grau de comprometimento das outras células do sistema imunológico (Ferrandez e De La Fuente, 1999) e também dos estímulos ocorridos aleatoriamente durante o processo de envelhecimento (LLOBERAS e CELADA, 2002).

Para processar os microorganismos ou os "debris" celulares fagocitados, os macrófagos precisam produzir substâncias com alta capacidade lítica, como é o caso dos produtos envolvidos no "burst" respiratório (aumento da captação do O_2) (Plackett *et al.*, 2004). Dentre estes produtos, encontramos o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é o resultado do aumento da captação de oxigênio, seguida da redução do oxigênio em ânion superóxido (O_2^-), pela enzima *NADPH oxidase*, e a conseqüente dismutação (espontânea ou enzimática) do ânion superóxido (O_2^-) que forma então, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Pick e Mizel, 1981), importante germicida envolvido nas atividades microbicidas da fagocitose (KLEBANOFF, 1999).

Como observamos em nosso trabalho, houve um aumento equivalente a 3,3 vezes na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em relação aos animais Envelhecidos (EV).

Na literatura também observamos uma discordância nos resultados da produção de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), observando-se redução nos trabalhos de Costa Rosa *et al.* (1993) ou aumento, como mostrado por Ferrandez e De La Fuente, (1999). Isto pode ocorrer devido ao fato da fagocitose ser estimulada, *in vitro*, por diversas formas como: bactérias opsonizadas (ou preparado da parede de levedura ou *zimozan* opsonizado); lecitinas, como a concanavalina A; ou pelo éster de forbol ("phorbol myristate acetate", PMA), substância cancerígena. Em nosso estudo, demos a preferência para o uso do éster de forbol (PMA), devido ao fato de ser um potente estimulador da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), isto porque o éster de forbol (PMA) estimula diretamente na membrana a enzima *proteína quinase C* (PKC), que como consequência leva a fosforilação de diversas proteínas resultando na ativação direta da *NADPH oxidase* (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Dessa forma, o estímulo é mais direto, não precisando dos passos anteriores a ativação da *proteína quinase C* (PKC) que envolve ativação de receptores de membrana mediados pela proteína G, e como consequência, o efeito promovido pelo éster de forbol (PMA) se torna mais potente e prolongado que os desencadeados pelas respostas fisiológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Entendemos que seja este o motivo pelo qual encontramos resultados divergentes na literatura, já que o macrófago modula as suas ações de acordo com o estímulo que recebe do meio em que se encontra.

Estas diferenças encontradas na literatura em relação ao nosso estudo podem ser decorrentes, também, da utilização de diferentes locais de obtenção das células (macrófagos alveolares, peritoneais, pleural, células de Kupfer) e sabe-se que o local determina as características que os macrófagos assumem a partir do momento em que passam a residir no tecido (DÖRGER *et al.*, 2001).

Outra substância produzida por macrófagos com ação microbicida e tumoricida é o óxido nítrico (NO^-), que é produzido a partir da L-arginina sob a ação enzimática promovida pela *óxido nítrico sintetase (iNOS)*. Em cultura, macrófagos peritoneais sintetizam NO^- em resposta ao LPS (LIEW *et al.*, 1990).

Em nosso trabalho encontramos um aumento equivalente a 84% nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em relação aos animais Envelhecidos (EV), e como podemos verificar na literatura outros grupos apresentam resultados que confirmam os nossos, como os de Chorinchath *et al.* (1996), Morrison *et al.* (1993) e Sugiura *et al.* (2002). Já Lu *et al.*, 1999 demonstraram que o exercício em esteira por 4 meses, em camundongo, aumenta a produção de NO^- e a expressão do RNAm para a *óxido nítrico sintetase (iNOS)* em animais adultos (2 meses) mas não em animais envelhecidos (18 meses). Provavelmente, neste experimento, o tempo de exercício nos animais envelhecidos não foi suficiente para promover as alterações encontradas para os animais adultos, sendo necessário um tempo maior de treinamento para promover alterações equivalentes em animais envelhecidos.

Como vimos, em nosso estudo constatamos que o exercício foi capaz de aumentar as funções de quimiotaxia, produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO^-), nos animais envelhecidos e treinados (EV-TR) em comparação com os animais envelhecidos (EV). Isso mostra que a capacidade de migração frente a um estímulo está aumentada, junto com a capacidade produtiva, diminuindo o tempo de identificação, processamento e destruição de um possível patógeno (PLOWDEN *et al.*, 2004), e portanto, aumentando a resposta imunológica.

Nossos resultados mostraram que o treinamento moderado potencializou a maioria das funções avaliadas no processo de envelhecimento. Dessa forma, estes resultados nos levam a crer que o exercício moderado aeróbio exerce influência positiva na capacidade funcional de macrófagos.

Como existe uma estreita ligação entre as funções exercidas pelos macrófagos e o seu metabolismo (BUTTGEREIT *et al.*, 2000; NEWSHOLME *et al.*, 1989), já que estes fornecem a energia e moléculas necessárias para a execução das funções celulares, estudamos as principais vias metabólicas envolvidas na manutenção das funções exercidas pelos macrófagos.

6.3 Metabolismo de Macrófagos

A glicose e glutamina são os principais substratos envolvidos no metabolismo de macrófagos, sendo consumidos em altas taxas e utilizados para a síntese de macromoléculas e formação de energia, respectivamente (BUTTGEREIT *et al.*, 2000; COSTA ROSA, 1994; NEWSHOLME *et al.*, 1989; NEWSHOLME e LEECH, 1989).

Para investigar a utilização dos substratos envolvidos no metabolismo celular, estudamos a incubação de macrófagos *in vitro* em meio enriquecido com glicose e glutamina. Dessa forma, foi possível quantificar o consumo de glicose e a consequente produção de lactato, indicativo da capacidade de produção da via glicolítica anaeróbia; e também o consumo de glutamina e a produção de seus metabólitos correspondentes, glutamato e aspartato, indicativos da atividade da via glutaminolítica (NEWSHOLME e NEWSHOLME, 1989).

Também investigamos a capacidade de utilização de glicose e glutamina pelo Ciclo de Krebs, com os experimentos de descarboxilação de [U-¹⁴C]-Glicose e [U-¹⁴C]-Glutamina, para a detecção da produção de [U-¹⁴C]-CO₂ e com isso verificar se a utilização dos substratos estudados estão direcionados para o fornecimento energético (pelo aumento da descarboxilação no Ciclo de Krebs) (NEWSHOLME e NEWSHOLME, 1989).

Para quantificarmos o fluxo das vias metabólicas estudadas, avaliamos também a atividade máxima das enzimas *hexoquinase* e *glutaminase*. O

estudo da atividade máxima de uma enzima é utilizado como indicador quantitativo da atividade das vias metabólicas em questão (NEWSHOLME e LEECH, 1989), como é o caso da *hexoquinase*, indicadora da via glicolítica (Ardawi e Newsholme, 1982), e *glutaminase fosfato dependente*, indicadora do fluxo da via glutaminolítica (ARDAWI e NEWSHOLME, 1985; NEWSHOLME *et al*, 1986). Dessa forma, foi possível mapear os caminhos que estes principais substratos, glicose e glutamina, percorrem nos macrófagos e com isso, verificar se a relação entre a função e o metabolismo celular se mantém em ratos Envelhecidos-Treinados (EV-TR).

A glicose é um substrato utilizado por macrófagos principalmente para a formação de macromoléculas (COSTA ROSA, 1994; NEWSHOLME *et al.*, 1989). Na via glicolítica, inicialmente catalisada pela enzima *hexoquinase*, temos a formação de metabólitos, como o glicerol – 3 – fosfato que pode ser desviado para a síntese de triacilgliceróis e fosfolípidos, importantes constituintes da membrana celular. Além disso, a glicose também pode ser desviada para a via das pentoses, que fornece NADPH e ribose-5-fosfato, que é utilizada na síntese de purinas e pirimidinas, formando RNA, utilizado para a síntese de proteína.

Em nosso estudo, a incubação de macrófagos em presença de glicose, estudo indicativo da via glicolítica anaeróbia, mostrou um aumento equivalente a 2,5 vezes no consumo de glicose dos animais Envelhecidos-Treinado (EV-TR) em comparação aos animais Envelhecidos (EV); sendo que

este aumento não foi acompanhado pelo aumento na produção de lactato, mostrando um baixo fluxo da via glicolítica anaeróbia.

Com isso, ficou a questão sobre qual o destino do aumento da glicose captada observado nos experimentos de incubação. Para isso, verificamos a possibilidade do aumento da capacidade dos macrófagos em descarboxilar a glicose, ou seja, verificar se houve aumento da utilização da glicose pela via glicolítica aeróbia, que justificaria as baixas concentrações de lactato encontradas. Isto porque o lactato é formado a partir do piruvato, metabólito resultante da via glicolítica, que pode também ser direcionado para a mitocôndria celular e gerar oxaloacetato ou acetil-CoA, metabólitos do Ciclo de Krebs, e havendo a formação destes dois metabólitos haveria uma redução na conversão do piruvato a lactato, e consequentemente uma redução deste.

Em nosso estudo não constatamos alteração na capacidade em descarboxilar a glicose, mostrando que provavelmente a glicose, em ratos Envelhecidos-Treinados (EV-TR), está sendo direcionada para outro compartimento metabólico.

Com isso, investigamos a atividade máxima da enzima *hexoquinase* como um indicativo do fluxo da via glicolítica, que tem como produto final o piruvato e conseqüentemente, lactato. Constatamos, em nossos experimentos, um aumento equivalente 3,4 vezes na atividade máxima da *hexoquinase* dos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em relação aos

animais Envelhecidos (EV). Isso nos mostra que a utilização da glicose nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) pode ter sido direcionada para a via das pentoses e portanto, para a formação das bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas, utilizadas para a formação do RNA e DNA. Apesar do macrófago ser um tipo de célula terminal, que por consequência perdeu a sua capacidade de replicação, as vias das purinas e pirimidinas mostraram-se ativadas e, portanto, direcionadas à produção de diferentes proteínas importantes para a função celular (CURI, 2000; NEWSHOLME *et al*, 1987).

Além desta possibilidade, o aumento do consumo de glicose pode também ser justificado pelo aumento da própria via glicolítica, sendo que durante as suas reações, há o desvio do glicerol-3-fosfato, metabólito utilizado para a síntese de triacilglicerol. Com o desvio do glicerol-3-fosfato para a formação dos triacilgliceróis, há maior possibilidade de formação de membranas pelos macrófagos, já que o macrófago possui elevada capacidade em repor suas membranas, a cada 30 minutos uma quantidade equivalente ao total de membrana na célula é ressintetizada (AUGER e ROOS, 1992).

Com isso, o desvio de metabólitos da via glicolítica (como o glicerol-3-fosfato) ou a maior utilização da glicose para a via das pentoses, justifica a menor produção de lactato mesmo com o maior consumo de glicose por macrófagos obtidos de ratos Envelhecidos-Treinados (EV-TR).

Quando comparamos os animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) com os animais Adultos (AD), constatamos que o exercício moderado aeróbio foi capaz de restaurar a atividade da *hexoquinase* aos valores encontrados para os animais Adultos (AD), já que com o processo de envelhecimento houve uma redução equivalente a 72% na atividade máxima desta enzima. Este resultado foi equivalente ao encontrado por Costa Rosa *et al.* (1993) e Alvarez *et al.* (1996), que comparou a atividade máxima desta enzima em animais adultos (3 meses) e envelhecidos (12 meses). Neste trabalho, esta redução foi acompanhada pela diminuição da produção do ânion superóxido (O_2^-), potente agente microbicida com ação semelhante, ou mesmo precursor do peróxido de hidrogênio (H_2O_2); e do óxido nítrico (NO^-). Em nosso estudo não encontramos resposta semelhante, não havendo diferença na produção dos produtos secretados, este fato pode ser decorrente de diferença entre as idades dos animais de nosso estudo (18 meses) e os utilizados por Alvarez *et al.* (1996), animais com 12 meses. Levando-se em conta o tempo de envelhecimento, que pode agir diferentemente na resposta funcional dos macrófagos.

O aumento do consumo de glicose e da atividade máxima da enzima *hexoquinase*, nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR), vem de encontro ao observado nas atividades funcionais do mesmo grupo, já que como houve aumento de função de macrófagos, constatado pelo aumento da quimiotaxia, e produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico

(NO⁻), podemos esperar um aumento na utilização dos substratos necessários para funcionamento celular.

O aumento da via dos pentoses nos macrófagos dos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) também contribui para o aumento na formação de NADPH (COSTA ROSA *et al.*, 1993). Este agente redutor (NADPH) é essencial para o funcionamento das enzimas responsáveis pela formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO⁻), respectivamente *NADPH oxidase* e *óxido nítrico sintetase (iNOS)* (ALVAREZ *et al.*, 1996). Dessa forma, o aumento no fluxo das pentoses é justificado pelo aumento na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO⁻) em animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR), confirmando a relação existente do metabolismo e função celular.

Como constatamos, a utilização da glicose em macrófagos de ratos Envelhecidos-Treinados (EV-TR) está direcionada para os compartimentos sintéticos celulares, sendo importante a investigação dos compartimentos energéticos para justificar o aumento das funções dos macrófagos.

Para isso, estudamos a utilização da glutamina, pois se sabe que este aminoácido é o principal substrato energético em macrófagos, que quando descarboxilado no Ciclo de Krebs, fornece 12 mols de ATP por mol de substrato (CURI, 2000; NEWSHOLME *et al.*, 1989).

Em nosso estudo, não verificamos aumento do consumo deste substrato, e, portanto, não houve aumento na produção de glutamato (que seria um indicativo do aumento de substrato para a via glutaminolítica), e também, não houve aumento na produção de aspartato (metabólito final da via glutaminolítica). Estes dados foram confirmados pelos experimentos de descarboxilação, que não mostraram aumento na produção de [U-¹⁴C]-CO₂ a partir da utilização pelo Ciclo de Krebs de [U-¹⁴C]-Glutamina.

Em contrapartida, quando avaliamos a atividade máxima da enzima *glutaminase fosfato dependente*, responsável pela formação de Glutamato a partir de Glutamina, e portanto indicadora da utilização de glutamina pelo macrófago, observamos um aumento equivalente a 3,4 vezes nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR) em relação aos animais Envelhecidos (EV).

Este aumento da atividade máxima da enzima *glutaminase fosfato dependente* nos animais Envelhecidos-Treinados (EV-TR), é um indicativo da capacidade máxima desta enzima e não é unicamente um indício do aumento do fluxo da via glutaminolítica, já que para isso, além do aumento da atividade máxima da enzima seria necessário o aumento do consumo de glutamina (avaliado nos experimentos de incubação e descarboxilação).

Dessa forma, nossos resultados mostram que o aumento da atividade funcional dos macrófagos em ratos Envelhecidos submetidos a Treinamento aeróbio moderado é acompanhado apenas pelas alterações no metabolismo de glicose.

7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, concluímos que o treinamento moderado em natação:

- ✖ Melhora a capacidade funcional de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de ratos envelhecidos (15 a 18 meses de idade), principalmente aumentando a capacidade de quimiotaxia, produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produção de óxido nítrico (NO^-).
- ✖ Estas alterações foram acompanhadas pelo aumento no metabolismo de glicose, responsável pela síntese de macromoléculas e fornecimento de NADPH, sendo este último, utilizado para a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e produção de óxido nítrico (NO^-).

Dessa forma, este estudo demonstra o efeito positivo do exercício moderado sobre alguns aspectos do sistema imunológico de ratos envelhecidos, aspectos estes, exercidos indiretamente pelo aumento das funções e do metabolismo de macrófagos residentes da cavidade peritoneal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular & molecular**. Rio de Janeiro: Revinter 2000. 486p.
- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annual Review Immunology**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- ALLAVENA, P.; BIANCHI, G.; LUINI, W.; DONI, A.; TRANSIDICO, P.; SOZZANI, Macrophage secretory products. In: PAULNOCK, D.M. (Ed.) **Macrophages**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 115-26.
- ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 154, p. 689-700, 1976.
- ALVAREZ, E.; MACHADO, A.; SOBRINO, F.; SANTA-MARCIA, C. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophage. **Cellular Immunology**, v. 169, p. 152-155, 1996.
- ARDAWI, M.S.M. ; NEWSHOLME, E.A. Maximal activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, v. 208, p. 743-748, 1982.
- 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.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E.; MÖLLER, H.; PFLEIDER, G. L-aspartate and L-asparagine. In: BERGMEYER, H.U. (Ed.) **Methods of enzymatic analysis**. London: Academic Press, 1974.
- 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. p. 1704-1708.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine interactions: Facts and Hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64-102, 1996.
- BRENNER, I.K.M.; SHEK, P.N.; SHEPHARD, R.J. Heat exposure and immune function: Potential contribution to the exercise response. **Exercise Immunology Reviews**, v. 1, p. 49-80, 1995.
- BUTTGEREIT, F.; GERD-RÜDIGER, B.; BRAND, M.D. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. **Immunology today**, v. 21, n. 24, p.194-199, 2000.
- CEDDIA, M.A.; WOODS, J.A. Exercise suppresses macrophage antigen presentation. **Journal Applied Physiology**, v. 87(6), p. 2253-2258, 1999.

CHORINCHATH, B.B.; KONG, L.Y.; MAO, L.; McCALLUM, R.E. Age-associated differences in TNF- α and nitric oxide production in endotoxic mice. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 1525-1530, 1996.

COONEY, D.; DAVIS, R.; VAN ATTA, G. A spectrophotometric method for the simultaneous measurement of L-glutamine and L-asparagine in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 40, n. 2; p. 312-26, 1971.

COSTA ROSA, L.F.B.P. **Efeito da adrenalina sobre o metabolismo do macrófago**: regulação da produção de peróxido de hidrogênio. 144 f. Tese (Doutorado em ciências, fisiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

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 & Behaviour**, v. 53, p. 651-656, 1993.

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. 651-656, 1993.

COSTA ROSA, L.F.B.P.; VAISBERG, M. Exercício Físico e Sistema Imunológico. In: DE MELLO, M.T.; TUFIK, S. **Atividade física, Exercício Físico e Aspectos psicobiológicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

CRABTREE, B; NELSHOLME, E.A. The activities of phosphorilase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**, v. 126, p. 49-58, 1972.

CURI, R. **Glutamina**: metabolismo e aplicações clínicas e no esporte. Rio de Janeiro: Sprint, 2000. 260 p.

CURTHOYS, N.P.; LOWRY, O.H. The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal, acidotic and alkalotic rat kidney. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p.162-168, 1973.

DE LA FUENTE, M. Changes in the macrophage function with aging. **Comparative biochemistry and physiology: A, Comparative physiology**, v. 81, n. 4, p. 935-938, 1985.

DE LA FUENTE, M.; MIGUEL, J.; CATALAN, M.P.; VICTOR, V.M.; GUAYERBAS, N. The amount of thiolic antioxidant ingestion needed to improve several immune functions is higher in aged than in adult mice. **Free Radical Research**, v. 36, p. 119-126, 2002.

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 Applied Physiology**, v. 80(1), p. 261-270, 1996.

DING, A.H.; NATHAN, C.R.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal

macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **Journal of Immunology**, v.141, p. 2407-2411, 1988.

DÖRGER, M.; MÜNZING, S.; ALLMELING, A.; MESSMER, K.; KROMBACH, F. Phenotypic and Functional differences between rat alveolar, pleural, and peritoneal macrophages. **Experimental Lung Research**, v. 27, p. 65-76, 2001.

ENGLE, P.C.; JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. **Analytical Biochemistry**, v. 88, p. 475-484, 1978.

ERNST, D.N.; WEIGLE, O.; HOBBS, M.V. Aging and lymphokine gene expression by T cell subsets. **Nutrition Reviews**, v. 53 (4 Pt 2), p. S18S-S26, 1995.

FEHR, H.G.; LOTZGERICH, H.; MICHNA, H. Influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies. **International Journal of Sports Medicine**, v. 9, p. 77-81, 1988.

FERRANDEZ, M.D.; DE LA FUENTE, M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 166, p. 47-55, 1999.

FIELD, C.J.; GOUGEON, R.; MARLISS, E.B. Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. **Journal Applied Physiology**, v. 71, p. 1089-97, 1991.

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**, v. 18 Suppl1, p. S22-S27, 1997.

FORNER, M.A.; BARRIGA, C.; RODRIGUES, A.B.; ORTEGA, E. A study of the role of corticosterone as a mediator in exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis. **Journal of Physiology**, v. 488.3, p. 789-794, 1995.

FORNER, M.A.; COLLAZOS, M.E.; BARRIGA, C.; DE LA FUENTE, M.; RODRÍGUEZ, A.B.; ORTEGA, E. Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 75, p. 179-189, 1994.

FU, Y-K.; ARKINS, S.; LI, Y.M.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Reduction in superoxide anion secretion and bactericidal activity of neutrophils from aged rats: reversal by combination of γ interferon and growth hormone. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1-8, 1994.

FURTH, R.; VAN AND SLUITER, W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. **Journal of Experimental Medicine**, v. 163, p. 474-479, 1986.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Atlas de Histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 322p.

- GESSANI, S.; FANTUZZI, L.; PUDDU, P.; BELARDELLI, F. Purification of macrophage. In: PAULNOCK, D.M. (Ed.) **Macrophages**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 31-60.
- 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. 666-672, 1983.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGWSKI, J. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2000. 496p.
- HANDEL-FERNADEZ, M.E.; LOPEZ, D.M. Isolation of macrophages from tissue, fluids, and immune response sites. In: PAULNOCK, D.M. (Ed.) **Macrophages**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 1-30.
- HENRIKSSON, J. Effects of physical training on the metabolism of skeletal muscle. **Diabetes Care**, v. 15, n. 11, p. 1701-1711, 1992.
- HIROKAWA, K. Reversing and restoring immune functions. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 93, p. 119-24, 1997.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA **Censo 2000**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 20 maio 2004.
- IMAHORI, K. How I understand aging. **Nutrition Reviews**, n.50, p.351-352, 1992.
- JANEWAY, C.A.; TRAVES, P. **Immunobiology: The immune System in Health and Disease**, 2nd ed. Londres: Current Biology Ltd, 1996. 570 p.
- KENNEY, R.A. **Physiology of aging: a synopsis**. London: Year Book Medical Publishers, 1989. 157 p.
- KIRSTEN, E.; KIRSTEN, R.; ARESE, P. Behavior of free amino acids, high-energy phosphoric acid compounds and some glycolytic and tricarboxylic acid cycle substrates in the muscles of *Locusta migratory* during work. **Biochemische Zeitschrift**. v. 337;p.167-78, 1963.
- 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.
- KLEBANOFF, S.J. Oxygen metabolites from phagocytes. In: GALLIN, J.I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999, 1335 p.
- KRIKETOS, A.D.; PAN, D.A; SUTTON, J.R.; HOH, J.F.Y; BAUR, L.A.; COONEY, G.J; JENKINS, A.B.; STORLIEN, L.H. Relationships between muscle membrane lipids, fiber type, and enzyme activities in sedentary and exercised rats. **American journal of physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology.**, v.269, p. R1154-R1162, 1995.

LANCHA JUNIOR, A. H. **Papel da geração de oxaloacetato no exercício físico moderado em ratos:** consequências da suplementação de aspartato, asparagina e carnitina. 76 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

LANDMANN, R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 22 (supplement 1), p. 30-36, 1992.

LEWIS, C.E.; MCGEE, J. O'D. (Eds.) **The natural immune system: The macrophage.** Oxford: IRL Press, 1992. 423p.

LIEW, F.Y.; MILLOTT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794-4797, 1990.

LLOBERAS, J.; CELADA, A. Effect of aging on macrophage function. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 1323-1329, 2002.

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. 265-275, 1951.

LU, Q., CEDDIA, W.A., PRICE, E.A., YE, S.M.; WOODS, J.A. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytolysis in young and old mice. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. R482-R489, 1999.

MACKINNON, L.T. Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. **International Journal of Sports Medicine**, v. 19 Suppl3, p. S205-S211, 1998.

MACKINNON, L.T. Overtraining effects on immunity and performance in athletes. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 502-509, 2000.

MAHAN, M.P.; YOUNG, M.R. Immune parameters of untrained or exercise-trained rats after exhaustive exercise. **Journal Applied Physiology**, v. 66, p. 282-287, 1989.

MAKINODAN, T; KAY, M.M.B. Age influence on the immune system. **Advances in Immunology**, v. 29, p. 287-332, 1980.

MCCARTHY, D.A.; DALE M.M. The leucocytosis of exercise. A review and model. **Sports Medicine**, v. 6, p. 333-363, 1988.

MENEGUELLO, M.O. **Alterações do metabolismo de macrófagos e linfócitos após a perda de peso em ratos envelhecidos:** Efeito da restrição calórica ou do Exercício aeróbio. 161 p. Dissertação (Mestrado em Educação Física) – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

MEURET, G.; HOFFMANN, G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. **British Journal of Haematology**, v. 24, p. 275-285, 1973.

MILLER, R.A; NADON, N.L. Principles of animal use of gerontological research. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 55, p. B117-B123, 2000.

MORRISON, D.C.; CHEN, L.C.; PACE, J.L. Altered regulation of nitric oxide production in vitro by macrophages from senescent mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 54, p. 575-580, 1993.

NEWSHOLME, E.A. ; LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical science**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 952 p.

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. 631-636, 1987.

NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Rates of utilization of glucose, glutamine and oleate and formation of end-products by mouse peritoneal macrophages in culture. **Biochemical Journal**, n. 162, v. 1, p. 211-218, 1989.

NIELSEN, H.B.; PEDERSEN, B.K. Lymphocyte proliferation in response to exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 75, p. 373-379, 1997.

NIEMAN, D.C. Exercise immunology: practical applications. **International Journal of Sports Medicine**, v. 18 Suppl1, p. S91-S100, 1997.

NIEMAN, D.C.; HENSON, D.A.; GUSENITCH, G.; WARREN, B.J.; DOTSON, R.C.; BUTTERWORTH, D.E. *et al.* Physical activity and immune function in elderly women. **Medicine and Science Sports Exercise**, v. 25, p. 823-31, 1993.

NIEMAN, D.C.; MILLER, A.R.; HENSEN, D.A.; WARREN, B.J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R.L. *et al.* Effect of High- versus moderate-intensity exercise on lymphocytes subpopulations and proliferative response. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15, p. 199-206, 1994.

NORTHOFF, H., WEINSTOCK, C., BERG, A. The cytokine response to strenuous exercise. **International Journal of Sports Medicine**, v. 15 (supplement 3), p. S167-S171, 1994

ONU - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS **Relatório sobre o desenvolvimento humano no Brasil, 1996. O novo padrão demográfico**. Disponível em: <<http://www.undp.org.br/hdr/hdr96/rdhub1-4.htm>>. Acesso em: 20 maio 2004.

ORTEGA, E.; COLLAZOS, M.E.; BARRIGA, C.; DE LA FUENTE, M. Effect of physical activity stress on the phagocytic process of peritoneal macrophages from old guinea pigs. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 65, p. 157-165, 1992.

ORTEGA, E.; FORNER, M.A.; BARRIGA, C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. **Journal of Physiology**, v. 498, n. 3, p. 729-734, 1997.

ORTEGA, E.; GARCIA, J.J.; SÁEZ, M.C.; DE LA FUENTE, M. Changes with aging in the modulation of macrophages by norepinephrine. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 118, p. 103-114, 2000.

PARRY-BILLINGS, M.; BLOMSTRAND, E.; McANDREW, N.; NEWSHOLME, E.A. A communicational link between skeletal muscle, brain, and cells of the immune system. **International Journal of Sports Medicine**, v. 11 Suppl2, p. S122-S128, 1990.

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. 216-269, 1999.

PEDERSEN, B.K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3 (jul), p. 1055-1081, 2000.

PEDERSEN, B.K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI Recovery of the immune system after exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 162, p. 325-332, 1998.

PEDERSEN, B.K.; TVEDE, N.; CHRISTENSEN, L.D.; KLARLUND, K.; KRAGBAK, S.; HALKJAER KRISTENSEN, J. Natural Killer cell activity in peripheral blood of highly trained and untrained persons. **International Journal of Sports Medicine**, v. 10, p. 129-131, 1989.

PETRICEVICH, V.L.; ALVES, R.C.B. Role of cytokines and nitric oxide in the induction of tuberculostatic macrophage functions. **Mediators of Inflammation**, v. 9, p. 261-269, 2000.

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.

PLACKETT, T.P.; BOEHMER, E.D.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Aging and innate immune cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, p. 291-299, 2004.

PLOWDEN, J.; RENSHAW-HOELSCHER, M.; ENGLEMAN, C.; KATZ, J.; SAMBHARA, S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. **Aging cell**, p. 161-167, 2004.

RAVAGLIA, G.; FORTI, P.; MAIOLI, F.; BASTAGLI, L.; FACCHINI, A.; MARIANI, E.; SAVARINO, L.; SASSI, S.; CUCINOTTA, D.; LENA, G. Effects of micronutrient status on natural killer cell immune function in healthy free-living subjects aged ≥ 90 y. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, p. 590-598, 2000.

ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 5° Ed. São Paulo: Manole, 2000. 294p.

- 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.; KOHNO, H.; KIMURA, K.; KOMURA, T.; ASAI, H.; INAI, R. *et al*/Physical activity and immune senescence in men. **Medicine and Science and Sports Reviews**, v. 27, p. 1516-1526, 1995.
- SHINKAI, S.; KONISHI, M.; SHEPHARD, R.J. Aging, Exercise, Training, and the Immune System. **Exercise Immunology Review**, v. 3, p. 68-95, 1997.
- SONG, L.; KIM, Y.H.; CHOPRA, R.K.; PROUST, J.J.; NAGEL, J.E.; NORDIN, A.A. *et al*. Age-related effects in T cell activation and proliferation. **Experimental gerontology**, v. 28, p. 313-321, 1993.
- SPIRDUSO, W. **Physical dimension in aging**. Champaign, IL: Human Kinetics, 1995.
- SUGIURA, H. SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; INABA, R; MIRBOD, S.M.; IWATA, H. Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 168, p. 413-420, 2000.
- SUGIURA, H.; NISHIDA, H.; SUGIURA, H.; MIRBOD, S.M. Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. **Acta Physiologica Scandinava**, v. 174, p. 247-256, 2002.
- SZAKAL, A.K.; AYDAR, Y.; BALOGH, P.; TEW, J.G. Molecular interactions of FDCs with B cells in aging. **Seminars in Immunology**, v. 14, p. 267-274, 2002.
- TANG, Y.; PIETRO, L.; FENG, Y.; WANG, X. Increased TNF- α and PGI₂, but not NO release from macrophages in 18-month-old rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 114, p. 79-88, 2000.
- TIMIRAS, P.S. (Ed.) **Physiological basis of aging and geriatrics**, 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. 326 p.
- TVEDE, N.; STEENSBERG, J.; BASLUND, B.; HALKJAER KRISTENSE, J.; PEDERSEN, B.K. Cellular immunity in highly trained elite racing cyclists during periods of training with high and low intensity. **Scandinavian Journal of Medicine and Science Sports**, v. 1, p. 163-166, 1991.
- UTSUYAMA, M.; ICHIKAWA, M.; CONO-SHIRAKAWA, A.; FUJITA, Y.; HIROKAWA, K. Retardation of the age-associated decline of immune functions in aging rats under dietary restriction and daily physical exercise. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 91, p. 219-228, 1996.
- VAN DER BERG, T.K.; DÖPP, E.A.; DIJKSTRA, C.D. Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. **Immunological Reviews**, v.184, p.45-57, 2001.
- 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. 387-394, 1988.

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. 387-394, 1988.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Associations between the neuroendocrine and immune systems. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, p. 137-150, 1995.

WICK, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P.; BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTEIN, B. Diseases of aging. **Vaccine**, v. 18, p.1567-1583, 2000.

WOODS, J.A. Exercise and neuroendocrine Modulation of Macrophage functions. **International Journal of Sports Medicine**, v. 21 Suppl1, p. S24-S30, 2000.

WOODS, J.A.; CEDDIA, M.A.; WOLTERS, B.W.; EVANS, J.K.; LU, Q.; McAULEY, E. Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. **Mechanisms of Ageing and development**, v. 109, p. 1-19, 1999.

WOODS, J.A.; DAVIS, J.M.; MAYER, E.P.; GHAFAR, A.; PATE, R.R. Effects of exercise on macrophage activation for antitumor cytotoxicity. **Journal Applied Physiology**, v. 76 (5), p. 2177-2185, 1994

WOODS, J.A.; DAVIS, M.; SMITH, J.A.; NIEMAN, D.C. Exercise and cellular innate immune function. **Medicine and Science Sports Exercise**, v. 31, n. 1, p. 57-66, 1999b.

WOODS, J.A.; LU, Q.; CEDDIA, M.A.; LOWDER, T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 545-553, 2000.

ANEXO 01

Anexo 01 - Progressão do peso dos animais Envelhecidos (EV) e Envelhecidos-Treinados (EV-TR) durante as 6 semanas correspondentes ao treinamento moderado em natação. Os dados correspondem à média em gramas (g) $\pm$ EPM (n).

	EV	EV-TR
	Peso (g)	
1º semana	426,1 $\pm$ 12,7 (11)	475,7 $\pm$ 6,7 (49)*
2º semana	457,0 $\pm$ 14,3 (11)	475,5 $\pm$ 7,3 (49)*
3º semana	437,8 $\pm$ 14,8 (11)	468,2 $\pm$ 6,9 (49)*
4º semana	432,9 $\pm$ 15,6 (11)	458,6 $\pm$ 6,8 (49)* ^{2,3}
5º semana	434,1 $\pm$ 14,8 (11)	453,6 $\pm$ 6,7 (49)* ^{1,2,3}
6º semana	435,4 $\pm$ 15,1 (11)	450,6 $\pm$ 6,7 (49)* ^{1,2,3}

Legenda: AD = Adultos; EV = Envelhecidos e EV-TR = Envelhecidos-Treinados.
Análise estatística: ANOVA, seguido do Teste de Tukey.

* $p < 0,05$ em comparação aos animais ENVELHECIDOS (EV), na mesma semana.

¹ $p < 0,05$ em comparação ao peso do grupo EV-TR na 1ª Semana.

² $p < 0,05$ em comparação ao peso do grupo EV-TR na 2ª Semana.

³ $p < 0,05$ em comparação ao peso do grupo EV-TR na 3ª Semana.

ANEXO 02

Anexo 02 - Reagentes utilizados.

Reagente	Sigla	Fórmula química	Fornecedor
α -cetoglutarato			Amresco
[U- ¹⁴ C]-glicose			Amershan
[U- ¹⁴ C]-glutamina			Amershan
2-feniletilamina			Sigma
5,5'-dithio-bis 2-ácido nitrobenzóico	DTNB		Sigma
Acetona		CH ₃ COCH ₃	Mallinckrodt
Ácido etileno diaminotetra acético sal dissódico	EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ x 2H ₂ O	Synth
Ácido orto-fosfórico		H ₃ PO ₄	Ecibra
Ácido tricloroacético	TCA	CCl ₃ COOH	Mallinckrodt
Adenosina di-fosfato	ADP		Amresco
Adenosina tri-fosfato	ATP		Amresco
Albumina livre de gordura	BSA		Sigma
Antibiótico (estreptomicina e penicilina)			Gibco brl
Asparaginase (E.C. 3.5.1.1)			Sigma
Azida sódica		NaN ₃	Amresco
Azul de Trypan			Sigma
Bicarbonato de sódio		NaHCO ₃	Synth
Cloreto de cálcio		CaCl ₂ .2H ₂ O	Synth
Cloreto de potássio		KCl	Synth
Cloreto de sódio		NaCl	Sigma
Coenzima A	CoA		Sigma
Creatina fosfato		C ₄ H ₆ N ₃ O ₄ PNa ₂	Sigma
<i>Creatina quinase</i> (E.C. 2.7.3.2)	CK		Sigma

Continua

Reagente	Sigla	Fórmula química	Fornecedor
EcoLume			ICN
Éster de forbol-miristato	PMA		Sigma
Etanol		CH ₃ CH ₂ OH	Synth
Fenol vermelho (phenol red)			Amresco
Folin – Ciocalteus (reagente de fenol)			Merk
Fosfato de potássio dibásico anidro		K ₂ HPO ₄	Amresco
Fosfato de potássio monobásico		KH ₂ PO ₄	Synth
Fosfato de sódio dibásico anidro		Na ₂ HPO ₄	Amresco
Fosfato de sódio monobásico anidro		NaH ₂ PO ₄	Amresco
Glicerol		C ₃ H ₈ O ₃	Sigma
Glicina		C ₂ H ₅ NO ₂	Amresco
Glicose		C ₆ H ₁₂ O ₆	Synth
<i>Glicose 6 fosfato desidrogenase</i> (E.C. 1.1.1.49)	<i>G6PDh</i>		Sigma
<i>Glutamato desidrogenase</i> (E.C. 1.4.1.3)	<i>GDh</i>		Sigma
Glutamina		C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Amresco
Glutaminase fosfato dependente (E.C. 3.5.1.2)			Sigma
Hematoxilina			Sigma
<i>Hexoquinase</i> (E.C. 2.7.1.1)	<i>HK</i>		ICN
Hidrato de hidrazina		H ₄ N ₂	Sigma
Hidróxido de potássio		KOH	Synth
Hidróxido de sódio		NaOH	Sigma
Lipopolisacarídeo	LPS		Sigma
<i>Malato desidrogenase</i> (E.C. 1.1.1.37)	<i>MDh</i>		Sigma
Mercaptoetanol		C ₂ H ₆ O ₅	Amresco
Metanol		CH ₃ OH	Carlo Erba / analyticals
N - formyl - met - leu - phe	f-MLP		Sigma
N-(1-naphthyl)-ethylenediamine	Enediamina		Sigma

Continua

Reagente	Sigla	Fórmula química	Fornecedor
N-ethylmaleimide		$C_6H_7NO_2$	Sigma
Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato	NADP		Sigma
Nicotinamida adenina dinucleotídio o	NAD		ICN
Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida	NADH		Amresco
Nitrito de sódio		$NaNO_2$	Amresco
Oxaloacetato		$C_4H_4O_5$	Sigma
Óxido de mercúrio		HgO	Bakers analyzed
PBS tablet			ICN
<i>Peroxidase</i> (E.C. 1.11.1.7)			Amresco
RPMI 1640			Sigma
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Zymozan)			Fermentos Fleischmann Ltda
Silicone			Synth
Soro fetal bovino			Sigma
Sulfanilamida		$C_6H_8N_2O_2S$	Mallinckrodt
Sulfato de alumínio e amônia		$AlNH_4(SO_4)_2 \times 12 H_2O$	Synth
Sulfato de cobre		$CuSO_4.5H_2O$	Synth
Sulfato de magnésio heptohidratado		$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Reagen / quimibrás
Tartarato de sódio e potássio		$KNaC_4H_4O_6 \times 4H_2O$	Reagen / quimibrás
<i>Transaminase glutâmica oxaloacética</i> (E.C. 2.6.1.1)	<i>GOT</i>		ICN
Tris-aminometano		$C_4H_{11}NO_3$	Vetec
Tris-HCl		$C_4H_{12}NO_3Cl$	Amresco
Triton X-100		-	Sigma