

EFEITO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO EXERCÍCIO AERÓBIO EM LINFÓCITOS E MACRÓFAGOS DE RATOS ENVELHECIDOS

Marcela Oliveira MENEGUELLO*
Luis Fernando Bicudo Pereira COSTA ROSA*

RESUMO

O envelhecimento é marcado por inúmeras alterações fisiológicas, dentre as quais ressaltamos as profundas modificações na resposta do sistema imunológico. Várias são as estratégias para se reverter ou minimizar estas alterações e dentre elas tem-se a Restrição Calórica e o Exercício Aeróbico. Portanto, o propósito deste estudo foi investigar o efeito da Restrição Calórica e do Exercício Aeróbico sobre o Sistema Imunológico de ratos envelhecidos. Para isso foram utilizados ratos ADULTOS (AD) e ENVELHECIDOS, sendo estes divididos em controle (EV), submetidos à Restrição Calórica (RC) e Exercitados (EX), todos por seis semanas. Nestes animais mediu-se o peso e a composição protéica dos órgãos linfóides Timo e Baço e as concentrações séricas de Glutamina, Interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3) e Imunoglobulinas (IgA e IgG). Dentre as células do Sistema Imunológico estudou-se os linfócitos e macrófagos. Os linfócitos foram obtidos do linfonodo mesentérico e do sangue total e a capacidade proliferativa foi medida na presença de mitógenos, Concanavalina A e Lipopolissacarídeos. Os macrófagos obtidos da cavidade peritoneal foram estudados através da medida da capacidade fagocitária e de produção de peróxido de hidrogênio. Com relação ao envelhecimento, nossos resultados comprovaram algumas alterações no sistema imunológico, principalmente na capacidade funcional de macrófagos. Os protocolos de RC e EX mostraram-se eficientes em aumentar a resposta fagocitária e a produção de H₂O₂ por macrófagos e também foram capazes de diminuir a capacidade proliferativa de linfócitos presentes no sangue.

UNITERMOS: Envelhecimento; Emagrecimento; Sistema imunológico; Restrição calórica; Exercício aeróbico; Macrófagos; Linfócitos.

INTRODUÇÃO

Uma das maiores mudanças observadas no século XX foi o aumento da longevidade do ser humano, sendo que hoje a expectativa de vida equivale a quase o dobro da idade alcançada no início do século (OMS, 2000).

Com isso, é imprescindível uma adaptação da sociedade a essa nova realidade, possibilitando uma melhor qualidade de vida para os idosos, atendendo principalmente suas necessidades na área de saúde, uma vez que os maiores gastos com a saúde ocorrem nos últimos anos de vida (Wick, Jansen-Durr, Berger, Blasko &

Grubeck-Loebstein, 2000).

Dentre as alterações encontradas com o avanço da idade observamos a queda na eficiência de algumas funções fisiológicas, como ocorre com o sistema imunológico. Hoje, sabe-se que este sistema, além de sua clássica função na defesa contra agentes externos, contribui para a manutenção do equilíbrio interno do organismo (MacKinnon, 1998), fazendo com que algumas mudanças em suas funções desestabilizem outros sistemas corporais.

Estas alterações encontradas na

* Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

resposta imunológica de humanos, camundongos e ratos (Pawelec, Effros, Caruso, Remarque, Barnet & Solana, 1999; Venkatraman & Fernandes, 1997; Wick et alii, 2000), leva a imunosenescência, conforme citam Shinkai, Konishi & Shephard (1997), um estado de desequilíbrio da resposta imunológica, uma vez que algumas funções imunológicas se encontram diminuídas e outras aumentadas, como a concentração plasmática de imunoglobulinas (Bucley III, Bucley & Dorsey, 1974; Hallgren, Buckley III, Gilberstein & Yunis, 1973; Paganelli, Quinti, Fagiolo, Cossarizza, Ortolani, Guerra, Sansoni, Pucillo, Scala, Cozzi, Bertollo, Monti & Franceschi, 1992). Estas alterações estão relacionadas ao aumento da morbidade e mortalidade em seres humanos, além de serem responsáveis pela maior incidência de infecções, doenças auto-imunes e câncer.

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

Como visto, vários estudos mostram que o envelhecimento leva a inúmeras alterações no sistema imunológico, e muito se tem estudado acerca das formas de melhorar este quadro de imunossupressão. Dentre estas formas encontramos as manipulações dietéticas, com destaque para a restrição calórica (RC) que, quando oferecida a roedores desde o nascimento, é capaz de promover um aumento no seu tempo de vida (Holloszy, 1992; Weindruch, 1996), e também melhorar alguns aspectos da resposta do Sistema Imunológico (Bradley & Xu, 1996; Pahlavani, Harris & Richardson, 1995; Weindruch, 1996).

Nos últimos anos, alguns autores têm mostrado que o exercício físico também pode alterar a resposta imunológica durante o envelhecimento (Fielding & Evans, 1997). Hirokawa (1997) coloca o exercício como uma das

manipulações para reverter e restaurar as funções imunológicas no envelhecimento, melhorando o quadro de infecções, desordens auto-imunes e malignidades (Shinkai, Konishi & Shephard, 1997). Fielding e Evans (1997) mostram que o exercício seria uma maneira de equilibrar a diminuição da resposta imunológica do organismo, que de certa forma contribui para a morbidade e mortalidade da população idosa (Bradley & Xu, 1996).

Apesar destes achados, a literatura mostra controvérsias quanto às alterações do sistema imunológico promovidas pelo exercício. Isso se deve ao fato de que o exercício promove adaptações diferenciadas quanto a sua intensidade, duração, frequência e tipo (estático e dinâmico). De uma forma geral, estudos mostram que exercício de intensidade moderada leva a uma melhora da resposta imunológica (Hirokawa, 1997; Mackinnon, 1998; Nieman, 1997; Nieman, Miller, Hensen, Warren, Gusewitch, Johnson, Davis, Butterworth, Herring & Nehlsen-Cannarella, 1994; Shephard, Rhind & Shek, 1994). Assim, o exercício moderado é indicado para pessoas idosas como forma de restaurar a imunodepressão causada pelo envelhecimento (Shinkai, Konishi & Shephard, 1997; Venkatraman & Fernandes, 1997).

OBJETIVO

O propósito deste estudo foi investigar o efeito da Restrição Calórica e do Exercício Aeróbio sobre o Sistema Imunológico de ratos envelhecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

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

Descrição dos grupos experimentais

Ratos adultos (AD) com dois meses de idade. Ratos envelhecidos com idade entre 15 a 18 meses, subdivididos em três grupos: Controle

(EV), submetidos à Restrição Calórica (RC) por seis semanas, com ingestão equivalente a 50% da ingestão de ração medida previamente e Exercitados (EX) durante seis semanas, treinados em natação, segundo protocolo adaptado de Lancha Junior (1993).

Protocolo de treinamento

O treinamento correspondeu ao protocolo descrito por Lancha Junior (1993) que

foi adaptado para ratos envelhecidos. Durante seis semanas os animais foram treinados no início do período claro (entre 19-21 horas), por no máximo uma hora, cinco dias por semana e com sobrecarga atada à cauda equivalente a, no máximo, 2% do peso corporal do animal, corrigido semanalmente. A primeira semana de treinamento serviu para a adaptação dos animais ao meio líquido, sendo a sobrecarga e o tempo de treinamento progressivamente elevados, como ilustrado na TABELA 1.

TABELA 1 - Protocolo de treinamento em natação para ratos envelhecidos.

	1°	2°	3°	4°	5°
1a. semana	15 min / 0%	20 min / 0%	30 min / 0%	30 min / 0,5%	40 min / 0,5%
2a. semana	40 min / 0,5%	40 min / 1%	40 min / 1%	50 min / 1%	50 min / 1%
3a. semana	50 min / 1%	50 min / 1,5%	50 min / 1,5%	60 min / 1,5%	60 min / 1,5%
4a. semana	60 min / 1,5%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%
5a. semana	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%
6a. semana	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%	60 min / 2%

tempo = minutos (min), sobrecarga = %.

O treinamento foi realizado em sistema de natação, constituído por tanques com água circulante e temperatura constante a 31 °C (\pm 2 °C), desenvolvido por Vieira, Haebisch, Kokubun, Hell e Curi (1988).

Sacrifício

Os animais foram sacrificados por decapitação sem anestesia, no período da manhã, entre sete e 11 horas, 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) do Instituto de Ciências Biomédicas / USP.

Parâmetros avaliados no músculoesquelético

No músculo Gastrocnêmio (GASTRO) para estudo do efeito do treinamento aeróbio foi determinada a atividade máxima da enzima Citrato Sintase CS, segundo método de Alp, Newsholme e Zammit (1976).

Parâmetros séricos

Para as dosagens de substratos, hormônios e de citocinas, o SORO foi coletado

após centrifugação do sangue coagulado, a 400 x g, 20 minutos a 4 °C; e congelado a -70 °C. A glutamina foi determinada como descrito por Windmueller e Spaeth (1974). As Interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 foram determinadas pelos Kits comerciais BIOTRAK - Amershan Life Science, e as Imunoglobulinas IgA e IgG medidas pelo Kit BIOCLIN Quibasa Química Básica Ltda, São Paulo, Brasil.

Timo e Baço

O Timo e Baço foram removidos e imediatamente pesados e congelados. Foi realizada nestes órgãos, a extração protéica como descrito por Folch, Lees e Sloane-Stanley (1957) e determinada a quantidade de proteína pelo método descrito por Lowry, Rosebrough, Farr e Randall (1951).

Macrófagos

Os macrófagos da cavidade peritoneal foram coletados em PBS segundo método descrito por Costa Rosa, Almeida, Safi e Curi (1993), estas células mostraram uma viabilidade maior que 95%, determinada com azul de Trypan 1%.

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

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

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi medida utilizando-se o método descrito por Pick e Mizel (1981).

Linfócitos

Os linfócitos foram obtidos dos linfonodos mesentéricos de acordo com metodologia adaptada de Ardawi e Newsholme (1983) e detalhada por Vieira, Nascimento, Arizawa e Curi (1990). A população celular obtida através deste procedimento constitui-se de 60% de linfócitos T e 40% de linfócitos B, sendo a contaminação por macrófagos menor que 1% (Ardawi & Newsholme, 1983; Vieira et alii, 1990).

As células foram semeadas em placas de 96 Wells em meio de cultura RPMI 1640 (CORNING, NY, USA), 10% de soro fetal bovino

e antibiótico (estreptomicina - 2,5 µg / ml e penicilina 2,5 U/ml, GIBCO), com 5x10⁵ células por poço, estimuladas com os mitógenos para linfócitos T e B, 20 µl de Concanavalina -A (ConA, 5 µg / ml, Calder, Costa Rosa & Curi, 1995) e 20 µl de Lipopolissacarídeos (LPS, 20 µg/ml, Parry-Billings, Leighton, Dimitriadis e De Vasconcelos, 1989), respectivamente. As células foram mantidas a 37 °C, sob atmosfera com 5% CO₂: 95% ar.

O sangue utilizado para proliferação de células foi coletado em tubos heparinizados (0,2 mg / ml de sangue) e diretamente semeado em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI 1640 e, na proporção 1:10 (v/v).

Após o período de 48 horas de cultivo as células receberam 20 µl de solução contendo 0,2 µCi de [2-³H] – Timidina. Dezoito horas depois, foram coletadas automaticamente por coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis-filtro cat. No. 11731 (Skatron Combi, Suffolk, UK). Os discos de papel-filtro, contendo a radioatividade incorporada ao DNA das células, foram mergulhados em 1 ml de líquido de cintilação EcoLumeTM (ICN) e, após 24 horas, a radiação incorporada foi determinada em contador Liquid Scintillation Analyser, Tri-Carb 2100TR, Packard.

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

$$\text{ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO} = \frac{\text{Incorporação de [2-}^3\text{H]-timidina na presença de mitógenos}}{\text{Incorporação de [2-}^3\text{H]-timidina na ausência de mitógenos}}$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados na forma de média, erro padrão da média (EPM) e seu respectivo número de amostra (n) para cada grupo avaliado, e foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste paramétrico de 'Tukey'

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

RESULTADOS

Com o avanço da idade podemos observar um aumento do peso corporal em cerca de 74% dos animais ENVELHECIDOS (EV) em relação aos animais ADULTOS (AD), como ilustrado na TABELA 2.

TABELA 2 Peso corporal (g) e Ingestão de comida (g).

	Peso corporal	Ingestão calórica
AD	271,7 ± 15,50 (6)	21,8 ± 1,1 (6)
EV	473,0 ± 15,10 (23) *	22,9 ± 0,8 (14)
RC	383,9 ± 11,80 (21) * #	11,7 ± 0,3 (17) * #
EX	405,0 ± 8,60 (21) * #	22,0 ± 0,7 (13) &

* p < 0,05 para comparação com o grupo Adulto (AD).

p < 0,05 para comparação com o grupo Envelhecido (EV).

& p < 0,05 para comparação com o grupo em Restrição Calórica (RC).

Com os protocolos de emagrecimento observamos uma diminuição do peso corporal dos animais RC e EX, equivalente a 19 e 14% respectivamente (TABELA 2).

Apesar da diferença de peso encontrado nos animais ENVELHECIDOS, não foi observada nenhuma diferença no consumo de ração quando comparado ao consumo dos animais ADULTOS, ilustrado na TABELA 2.

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

Como forma de avaliar a efetividade do protocolo de exercício em natação a que os animais envelhecidos foram submetidos foi medida a atividade máxima da enzima Citrato Sintase no músculo gastrocnêmio dos animais EX. Esta enzima do metabolismo oxidativo, responsável pela entrada de carbono e, portanto manutenção do fluxo pelo Ciclo de Krebs (Newsholme & Leech,

1989), apresentou atividade máxima aumentada em cerca de 4,3 vezes nos animais EX (0,693 nmol / minuto x proteína⁻¹ ± 0,147, (4)) quando comparados aos animais ENV (0,161 nmol / minuto x proteína⁻¹ ± 0,019, (3)), sendo p < 0,05 para comparação dos dois grupos. Isso mostra que a intensidade e duração das sessões de natação utilizadas durante o treinamento dos animais foram capazes de melhorar a condição aeróbia dos mesmos.

Quanto ao timo, observou-se uma redução no peso do órgão nos animais EV. RC e EX da ordem de 11%, 78% e 33% (respectivamente) quando comparados aos animais AD, como ilustrado na TABELA 3. Com relação ao conteúdo protéico observou-se uma acentuada redução nos animais EV, RC, EX quando comparados aos animais AD, respectivamente da ordem de 28, 37 e 53% (TABELA 3). Quando comparados aos animais ENV (TABELA 3) o grupo EX mostrou uma redução da ordem de 35%.

TABELA 3 - Peso (g) e conteúdo protéico (mg de proteína / g de tecido) do Timo e Baço.

	Timo		Baço	
	Peso	Proteína	Peso	Proteína
AD	0,307 ± 0,020 (12)	89,3 ± 4,1 (8)	0,617 ± 0,028 (8)	45,8 ± 2,8 (8)
EV	0,277 ± 0,019 (30) *	64,8 ± 5,1 (8) *	0,875 ± 0,055 (20) *	50,1 ± 2,1 (12)
RC	0,097 ± 0,014 (6) *	56,5 ± 2,3 (6) *	0,798 ± 0,084 (7)	43,7 ± 2,1 (7)
EX	0,206 ± 0,020 (8) *	42,0 ± 4,9 (4) * #	0,794 ± 0,063 (8)	58,3 ± 5,5 (4) &

* p < 0,05 para comparação com o grupo Adulto (AD).

p < 0,05 para comparação com o grupo Envelhecido (EV).

& p < 0,05 para comparação com o grupo em Restrição Calórica (RC).

Com relação ao baço (TABELA 3) houve um aumento no peso nos animais EV da ordem de 42% (TABELA 3).

As concentrações de glutamina, ilustradas na TABELA 4, não se mostraram diferentes entre os grupos estudados. Não foi encontrada diferença entre as concentrações séricas

de IL-1 avaliada nos grupos estudados (TABELA 4). Com relação a IL-2, houve uma tendência à sua diminuição nos animais EV quando comparados aos AD, da ordem de 22%, como ilustrado na TABELA 4. Nos animais RC houve uma elevação dos valores encontrados em relação aos animais EV, equivalente a 30%, sendo que nos animais EX houve uma redução destas concentrações quando

comparadas àquelas observadas para os animais AD (36%) e RC (37%), como ilustrado na TABELA 4. Nos animais RC e EX houve uma tendência à redução dos valores séricos encontrados para a IL-6 quando comparados aos animais AD (respectivamente 26 e 55%) e EV (31 e 58%).

TABELA 4 - Concentração Sérica de Glutamina (nmol / ml soro), Interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 (pg / ml soro) e Imunoglobulina IgA e IgG (mg / ml soro).

	Glutamina	IL-1	IL-2	IL-6	IgA	IgG
AD	1855,2 ± 29,5 (5)	17,54 ± 1,85 (5)	112,67 ± 37,69 (5)	115,14 ± 36,39 (5)	ND	387,1 ± 7,4 (7)
EV	1827,5 ± 28,4 (7)	14,00 ± 0,84 (6)	87,70 ± 24,22 (5)	122,94 ± 37,10 (5)	22,2 ± 5,3 (8)	522,9 ± 121,9 (8)
RC	1865,0 ± 14,1 (7)	13,19 ± 0,86 (6)	114,40 ± 36,03 (5)	84,57 ± 20,66 (5)	29,8 ± 5,2 (8)	424,4 ± 12,5 (8)
EX	1778,1 ± 20,7 (7)	16,61 ± 2,26 (7)	72,38 ± 17,81 (7)	51,94 ± 12,53 (5)	ND	406,4 ± 11,0 (8)

ND = Não detectado.

A IgA foi detectada apenas no soro de animais EV e RC, como mostra a TABELA 3. Já a IgG se mostrou elevada em cerca de 35% nos animais EV em relação aos AD, e os animais RC e EX apresentaram uma redução da ordem de 20% quando comparados aos ENV (TABELA 4).

O índice de proliferação dos linfócitos presentes no sangue mostrou uma

tendência a elevação nos animais ENV e RC, quando comparados aos animais AD, após o estímulo com ConA (42 e 36% respectivamente) e LPS (58 e 49%), como mostra a TABELA 5. Quanto aos animais EX, os linfócitos mostraram uma redução da capacidade proliferativa quando estimulados com ConA (16% em relação aos AD, 46% EV e 44% RC) e LPS (62% ENV).

TABELA 5 Índice de proliferação de linfócitos presentes no sangue periférico e linfonodo mesentérico.

	Sangue		Linfonodo mesentérico	
	CONA	LPS	CONA	LPS
AD	1,10 ± 0,03 (11)	1,31 ± 0,08 (12)	1,39 ± 0,12 (12)	1,39 ± 0,08 (10)
EV	1,56 ± 0,25 (5)	2,07 ± 0,51 (5)	1,47 ± 0,18 (4)	1,23 ± 0,10 (4)
RC	1,50 ± 0,19 (7)	1,95 ± 0,50 (9)	1,27 ± 0,14 (8)	1,32 ± 0,10 (7)
EX	0,84 ± 0,04 (10) * &	1,28 ± 0,07 (4)	1,08 ± 0,03 (8)	1,22 ± 0,07 (9)

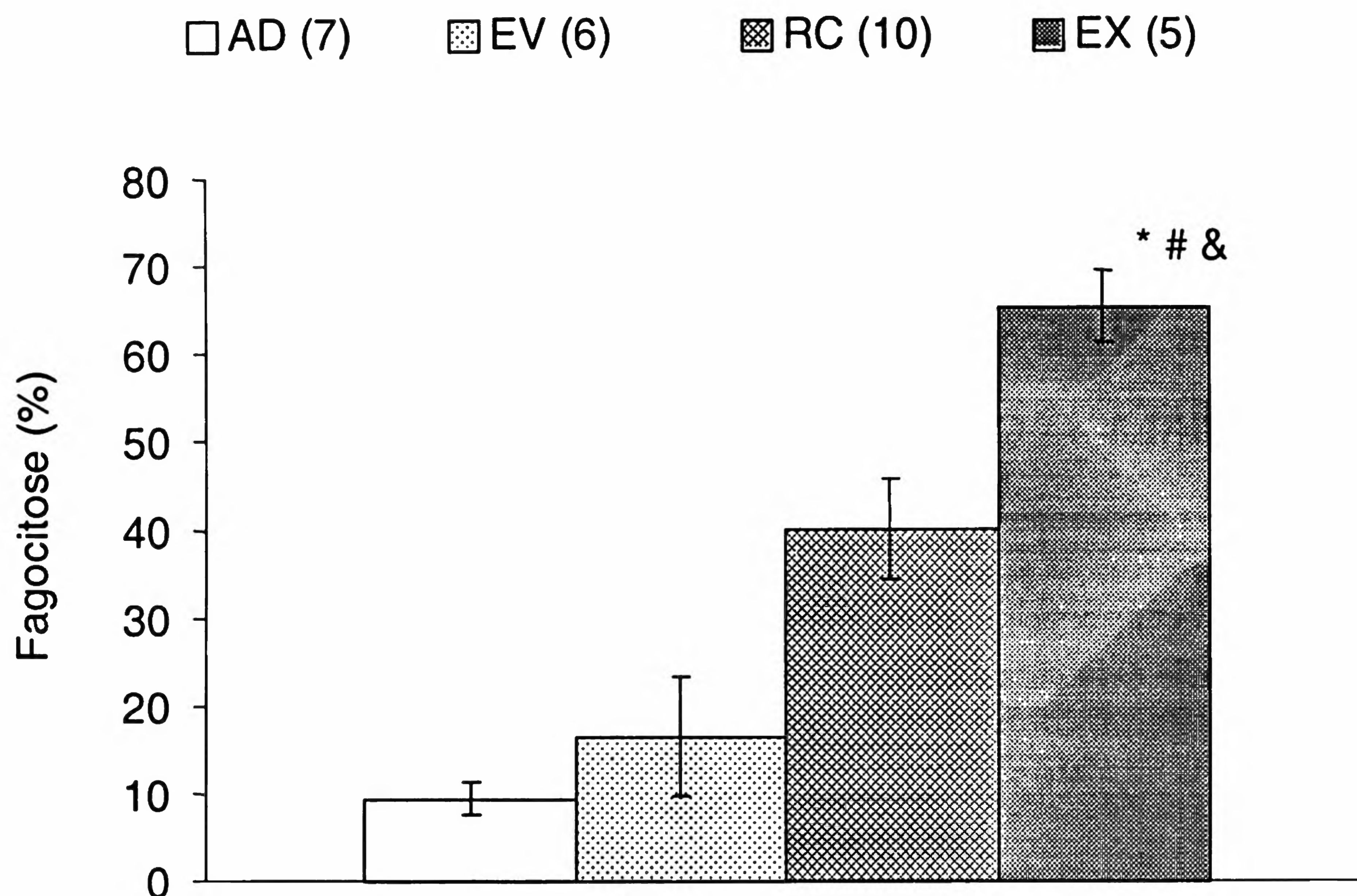
* p < 0,05 para comparação com o grupo Adulto (AD).

& p < 0,05 para comparação com o grupo em Restrição Calórica (RC).

Nos linfócitos presentes no linfonodo mesentérico nota-se uma diminuição dos valores encontrados para os animais EX e estimulados na presença de ConA, da ordem de 22% em relação aos AD e 27%, EV, como mostra a TABELA 5.

A capacidade fagocitária dos macrófagos nos animais EV mostrou uma

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



* $p < 0,05$ para comparação com o grupo Adulto (AD).

$p < 0,05$ para comparação com o grupo Envelhecido (EV).

& $p < 0,05$ para comparação com o grupo em Restrição Calórica (RC).

FIGURA 1 Capacidade Fagocitária (%) de macrófagos presentes na cavidade peritoneal.

Quanto à produção de H_2O_2 houve apenas uma tendência à elevação nas incubações de macrófagos de animais RC e EX quando

comparados àqueles obtidos de animais AD (respectivamente, 44 e 53%) e EV (28 e 36%), conforme ilustrado na FIGURA 2.

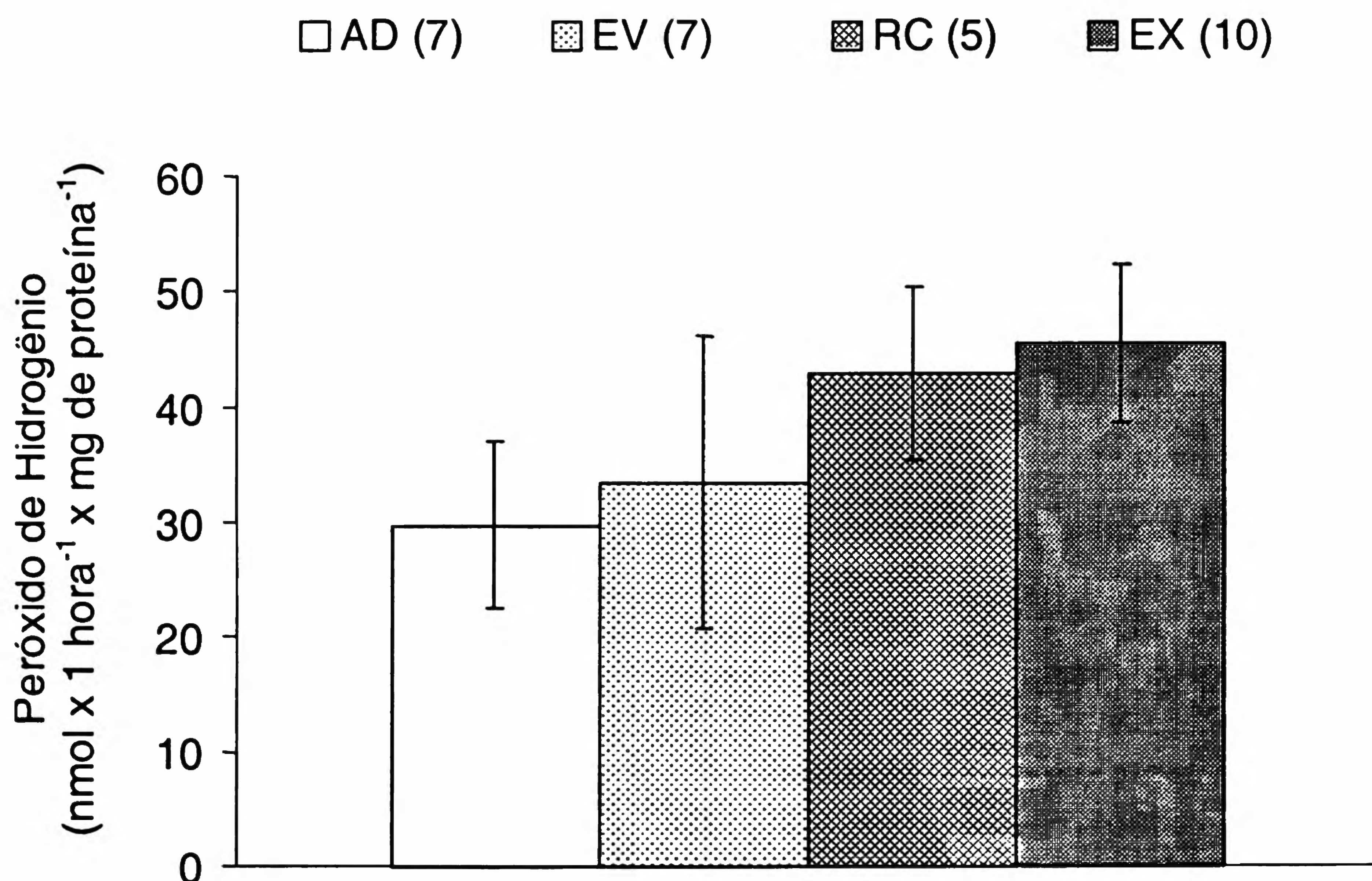


FIGURA 2 - Produção de Peróxido de Hidrogênio ($nmol \times hora^{-1} \times mg \text{ proteína}^{-1}$) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal.

DISCUSSÃO

O envelhecimento é um processo natural caracterizado pela inadequação dos mecanismos homeostáticos, que leva a uma progressiva perda da capacidade de resposta aos mais diferentes tipos de desafios, como ocorre com o sistema imunológico.

A involução tímica, junto à diminuição de seu conteúdo protéico (Almeida, 1994), observada durante o envelhecimento, parece preceder as alterações observadas na resposta imunológica (Hirokawa, Utsuyama, Kasai & Kurashima, 1992). Estudos mostram que quando o timo obtido de animais jovens é transplantado em animais envelhecidos há reversão de certas imunodeficiências características do envelhecimento (Hirokawa et alii, 1992). Desta forma, o timo poderia ser considerado o centro das alterações observadas no sistema imunológico com o avanço da idade, sendo chamado de “relógio do envelhecimento” por vários autores (Burnet, 1970).

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

No envelhecimento, o timo, órgão responsável pela maturação dos linfócitos T, sofre profundas alterações morfológicas (Globerson, 1995; Hobbs & Ernst, 1997; Miller, 1996) apresentando ainda diminuição no seu peso, bem como do seu conteúdo protéico, alterações que foram acentuadas com o emagrecimento promovido pela RC e EX.

Estas alterações podem ser justificadas pela diminuição da gordura presente no órgão, já que a proporção de gordura no Timo aumenta com o envelhecimento (Bertho, Demarquay, Moulian, Van Der Meer, Berrih-Aknin & Gourmelon, 1997). Com relação ao conteúdo protéico, a diminuição acentuada indica comprometimento da funcionalidade deste órgão, contribuindo para as alterações descritas para células T durante o envelhecimento (Shinkai, Konishi & Shephard, 1997; Venkatraman & Fernandes, 1997).

Nos últimos anos, grandes foram os avanços nos estudos relacionados ao quadro de imunossupressão que acompanha o processo de envelhecimento (Almeida, 1994; Ferrandez & De

La Fuente, 1999; Hirokawa, 1997; Makinodan & Kay, 1980; Pawelec et alii, 1999; Spence, 1995), principalmente no que se refere ao estudo dos Linfócitos T, células responsáveis pela segunda linha de defesa, e que tem seu metabolismo alterado principalmente devido à involução tímica (órgão responsável pela maturação e diferenciação das células T).

Como forma de se estimar a atividade das células imunológicas presentes na circulação foi quantificada a concentração sérica de citocinas nos animais estudados. No nosso estudo, a Interleucina 1 (IL-1) produzida principalmente por macrófagos ativados não mostrou valores diferenciados entre os quatro grupos avaliados. Já a IL-2, produzida pelos linfócitos T “helper” (Th1) mostrou uma tendência à diminuição nos animais ENV, que não foi corrigida pelo treinamento, em desacordo com os trabalhos citados por Venkatraman e Fernandes (1997) e Shinkai, Konishi e Shephard (1997). Esta queda na produção de IL-2 por animais envelhecidos seria, então, responsável pelo desvio da relação Th1/Th2 para uma maior participação das Th2, conforme descrito anteriormente. Neste aspecto a RC foi capaz de restaurar o equilíbrio entre estas populações, permitindo-nos sugerir que este seja um fator importante para a manutenção de resposta imunológica adequada e aumento da expectativa média de vida em animais submetidos à RC desde o desmame. A concentração sérica de IL-6 não se apresentou alterada. Nenhuma das formas de intervenção modificou este parâmetro.

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

As células B, cujas demais funções acredita-se estarem preservadas durante o envelhecimento não apresentaram alterações na resposta proliferativa ao LPS nos grupos avaliados.

Já em relação às imunoglobulinas, produzidas pelos linfócitos B, podemos observar que, de acordo com os achados de diversos outros pesquisadores (Bucley III, Bucley & Dorsey, 1974; Hallgren et alii, 1973; Paganelli et alii, 1992) encontramos maior concentração sérica de IgA e IgG com o envelhecimento. No caso da IgA a RC não alterou sua concentração. Já com relação as IgGs podemos observar que o exercício físico diminuiu suas concentrações a valores equivalentes àqueles encontrados para ratos AD.

Quanto aos macrófagos, o envelhecimento é capaz de levar a inúmeras alterações que, como mostrado na literatura, podem ser conflitantes (Ferrandez & De La Fuente, 1999).

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

Estes dados estão de acordo com Costa Rosa et alii (1993) e Ferrandez e De La Fuente (1999) que mostraram haver no envelhecimento um aumento da capacidade fagocitária.

Ainda quanto à capacidade funcional de macrófagos, com relação à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), Costa Rosa et alii, (1993) mostram uma diminuição na sua produção, sob o estímulo do acetato de forbol-miristato (PMA), enquanto que Ferrandez e De La Fuente (1999), demonstram o oposto, quando as células foram incubadas na presença de látex. Nos

resultados obtidos, observamos um aumento da produção de peróxido de hidrogênio nos animais submetidos à RC e EX, reforçando o aumento da capacidade funcional, que também pode ser justificada pelo aumento da atividade lisossomal encontrada nos macrófagos dos animais envelhecidos (Ortega, Collazos, Barriga & De La Fuente, 1992).

Provavelmente estes dados conflitantes se devem à diversidade de experimentos realizados até o momento na literatura, que utilizam estímulos que provocam respostas diferenciadas nos macrófagos. Além disso, acredita-se que em diferentes períodos do envelhecimento encontramos respostas diferenciadas nos macrófagos, provavelmente dependente do grau de comprometimento das outras células do sistema imunológico (Ferrandez & De La Fuente, 1999). Nossos dados demonstram que o treinamento e a RC não foram capazes de alterar as fases iniciais deste processo, que compreende internalização e destruição do material por parte de fagócitos (macrófagos, células dendríticas, entre outras).

Dessa forma, podemos concluir pelos resultados encontrados que a RC e o exercício físico influenciam a resposta imunológica de ratos envelhecidos, atuando, no entanto, sobre aspectos distintos da sua resposta. A RC mostrou ter um efeito positivo sobre os Linfócitos T, revertendo a diminuição da IL-2 encontrada no envelhecimento. A capacidade funcional dos macrófagos peritoneais, como observado pelo aumento da capacidade fagocitária e de produção de H_2O_2 , aumentou nos animais EX mostrando o efeito do Treinamento Aeróbio sobre o Sistema Imunológico.

ABSTRACT

EFFECTS OF CALORIC RESTRICTION AND AEROBIC EXERCISE IN LYMPHOCYTES AND MACROPHAGES OF AGING RATS

Ageing is marked by several physiological changes, among them we find a decline in several aspects of the immune system. Several strategies are utilized to revert or minimize these alterations; among them are Caloric Restriction and Aerobic Exercise. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effects of Caloric Restriction and Aerobic Exercise upon the immune cells of the aging rats. So we used ADULTS (AD) and AGE rats, divided in control (EV), submitted to 50% of caloric restriction (CR) and aerobic exercise (swimming) (EX), both for six weeks. In these animals we measured weight and protein contents of lymphoid organs Thymus and Spleen and seric concentration of Glutamina, Interleukins (IL-1, IL-2, IL-3) and Immunoglobulins (IgA e IgG). We determined the proliferative response of lymphocytes obtained from mesenteric lymph nodes and peripheral blood stimulated by the mitogens, Concanavalin A and

Lipopolissacarídeos. The macrophages obtained from the peritoneal cavity were studied through the measurement of the phagocytic capacity and hydrogen peroxide production. The RC and EX protocols increased the phagocytic response and H₂O₂ production by macrophages and decreased the proliferative response of lymphocytes obtained from the peripheral blood.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.F. **Alterações do metabolismo de glutamina com o envelhecimento: estudo em órgãos linfóides e linfócitos isolados.** 1994. 64f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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**, London, v.154, p.689-700, 1976.

ARDAWI, M.S.M.; NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochemical Journal**, London, v.212, p.835-42, 1983.

BERTHO, J.M.; DEMARQUAY, C.; MOULIAN, N.; VAN DER MEEREN, A.; BERRIH-AKNIN, S.; GOURMELON, P. Phenotypic and immunohistological analyses of the human adult thymus: evidence for an active thymus during adult life. **Cellular Immunology**, New York, v. 170, p.30-40, 1997.

BRADLEY, J.; XU, X. Diet, age and immune system. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v.54, n.11, p.S43-S50, 1996.

BUCKLEY III, C.E.; BUCKLEY, E.G.; DORSEY, F.C. Longitudinal changes in serum immunoglobulin levels in older humans. **Federation Proceedings**, Washington, v.33, p.2036-9, 1974.

BURNET, F.M. An immunological approach to ageing. **Lancet**, London, n.2, p.358-60, 1970.

CALDER, P.C.; COSTA ROSA, L.F.B.P.; CURI, R. Effects of feeding lipids of different fatty acid compositions upon rat lymphocyte proliferation. **Life Sciences**, Oxford, v.56, n.6, p.455-63, 1995.

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**, Oxford, v.53, p.651-6, 1993.

FERRANDEZ, M.D.; DE LA FUENTE, M. Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v.166, p. 47-53, 1999.

FIELDING, R.A.; EVANS, W.J. Aging and the acute phase response to exercise: implications for the role of systemic factors on skeletal muscle protein turnover. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.18, p.S22-7, 1997. Supplement.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 226, p.497-509, 1957.

GLOBERSON, A. T lymphocytes and aging. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, Basel, v.107, p.491-7, 1995.

HALLGREN, H.M.; BUCKLEY III, C.E.; GILBERSTEIN, V.A.; YUNIS, E.J. Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and auto antibodies in aging humans. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.111, p.1101-7, 1973.

HIROKAWA, K. Reversing and restoring immune functions. **Mechanisms of Ageing and Development**, Lausanne, v.93, p.119-24, 1997.

HIROKAWA, K.; UTSUYAMA, M.; KASAI, M.; KURASHIMA, C. Aging and immunity. **Acta Pathologica Japonica**, Tokyo, v.42, p.537-48, 1992.

HOBBS, M.V.; ERNST, D. T cell differentiation and cytokine expression in late life. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v.21, n.6, p.461-70, 1997.

HOLLOSZY, J.O. Exercise and food restriction in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.122, p.774-7, 1992.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBRUOGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Proteins measurements with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.193, p.265-75, 1951.

MACKINNON, L.T. Future directions in exercise and immunology: regulation and integration. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v.19, p.S205-11, 1998. Supplement.

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

MILLER, R.A. The aging immune system: primer and prospectus. *Science*, Washington, v.273, n.5, p.70-4, 1996.

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

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

NIEMAN, D.C.; MILLER, A.R.; HENSEN, D.A.; WARREN, B.J.; GUSEWITCH, G.; JOHNSON, R.L.; DAVIS, J.M.; BUTTERWORTH, D.E.; HERRING, J.L.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L. Effect of High-versus moderate-intensity exercise on lymphocytes subpopulations and proliferative response. *International Journal of Sports Medicine*, Stuttgart, v.15, p.199-206, 1994.

OMS. Organização mundial de Saúde. (WHO) Population division, department of economic and social affairs. *Ageing*. Disponível em <<http://www.popin.org/pop1998/8.htm>>. Acesso em: 15 maio 2000.

ORTEGA, E.; COLLAZOS, M.E.; BARRIGA, C.; DE LA FUENTE, M. Stimulation of the fagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *European Journal of Applied Physiology*, Berlin, v.64, p.323-7, 1992.

PAGANELLI, R.; QUINTI, I.; FAGIOLO, U.; COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; GUERRA, E.; SANSONI, P.; PUCILLO, L.P.; SCALA, E.; COZZI, E.; BERTOLLO, D.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v.90, p.351-4, 1992.

PAHLAVANI, M.A.; HARRIS, M.D.; RICHARDSON, A. The age-related decline in the induction of IL-2 transcription is correlated to changes in the transcription factor NFAT. *Cellular Immunology*, New York, v.165, p.84-91, 1995.

PARRY-BILLINGS, M.; LEIGNTON, B.; DIMITRIADIS, G.D.; DE VASCONCELOS, P.R.L.; NEWSHOLME, E.A. Skeletal muscle glutamine metabolism during sepsis. *International Journal of Biochemistry*, Bristol, v.21, p.419-23, 1989.

PAWELEC, G.; EFFROS, R.B.; CARUSO, C.; REMARQUE, E.; BARNETT, Y.; SOLANA, R. T cells and aging (update February 1999). *Frontiers in Bioscience*, Tampa, v.4, n. 1, p.216-69, 1999.

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*, Amsterdam, v.46, p.211-26, 1981.

SHEPHARD, R.J.; RHIND, S.; SHEK, P.N. Exercise and immune system: natural killer cells, interleukins and related responses. *Sports Medicine*, Auckland, v.18, n.5, p.340-69, 1994.

SHINKAI, S.; KONISHI, M.; SHEPHARD, R.J. Aging, exercise, training, and the immune system. *Exercise Immunology Review*, Champaign, v.3, p.68-95, 1997.

SPENCE, A.P. *Biology of human aging*. New Jersey: Prentice Hall, 1995.

VENKATRAMAN, J.T.; FERNANDES, G. Exercise, immunity and aging. *Aging of Clinical Experimental Research*, Milano, v.9, p.42-56, 1997.

VIEIRA, R.; HAEBISCH, H.; KOKUBUN, E.; HELL, N.S.; CURI, R. Swimming system for physical exercise of rats. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.31, p.387-94, 1988.

VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; CURI, R. Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, v.33, p.819-29, 1990.

WEINDRUCH, R. Caloric restriction and aging. *Scientific American*, New York, p.32-8, jan. 1996.

WICK, G.; JANSEN-DURR, P.; BERGER, P.; BLASCO, I.; GRUBECK-LOEBSTEIN, B. Diseases of aging. *Vaccine*, Guildford, v.18, p.1567-83, 2000.

WINDMUELLER, H.G.; SPAETH, A.E. Uptake and metabolism of plasma glutamine by small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v.249, p.5070-9, 1974.

Recebido para publicação em: 26 fev. 2002

Aceito em: 17 jul. 2002

ENDEREÇO: Marcela Oliveira Meneguello
Laboratório de Metabolismo
Instituto de Ciências Biomédicas - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - sala 302
05508-000 São Paulo - SP Brasil
e-mail: mom@usp.br