JULIANA RUIZ FERNANDES

Efeito do exercício físico na resposta imune celular de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2016

JULIANA RUIZ FERNANDES

Efeito do exercício físico na resposta imune celular de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Preparada pela Biblioteca da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Juliana Ruiz

Efeitos do exercício físico na resposta imune celular de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) / Juliana Ruiz Fernandes. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Gil Bernard.

Descritores: 1.Doença pulmonar obstrutiva crônica 2.Sistema imunológico
3.Exercício 4.Inflamação 5.Proliferação de células 6.Encurtamento do telômero

À Nelson Corrêa, padrinho muito querido.

Agradecimentos

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, que foram pessoas incríveis e essenciais para a realização de um grande sonho.

A minha mãe, irmã e avós, fonte de amor, apoio, e força incondicional.

Ao Rodrigo Gastaldello por toda a paciência, carinho, e cumplicidade durante toda esta caminhada.

Ao programa de pós graduação da Faculdade de Medicina e ao departamento de Dermatologia.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao Prof. Dr Alberto da Silva Duarte por toda a estrutura física e técnica do LIM 56 que me permitiram realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Gil Benard pela orientação, paciência e prontidão no atendimento das dúvidas, sua orientação foi engrandecedora.

Ao Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes de Carvalho, que foi um colaborador ativo auxiliando em todas as etapas deste trabalho.

As fisioterapeutas Cibele e Aline que não deixaram de lado esforços para que este trabalho fosse possível.

As minhas queridas amigas, Dra Léia Cristina Rodrigues da Silva e Dra Adriana Ladeira de Araújo que me ensinaram não só as técnicas, mas também como é fazer uma pós-graduação.

Aos meus queridos amigos Andrea Niquirilo, Lucas Piemonte, Carolina Cardona, Liã Barbara de Arruda, Daniel Rocha Lopes e Ana Paula Vieira que auxiliaram nos momentos de diversão e desespero, dando forças para continuar.

A equipe de Pneumologia do Hospital das Clínicas, especialmente a Dra. Regina, Dr. Frederico, Dra. Stella e Dr. Ubiratan que foram fundamentais para que este projeto fosse possível.

A Dra Rose e equipe do setor de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz pelo auxílio na preparação do antígeno utilizado neste trabalho.

A Maria de Jesus, Carol e Irineu do ambulatório de pneumologia por toda ajuda oferecida.

Aos funcionários da secretaria do LIM56 por todo auxílio oferecido.

À Noemia Orii, Rosângela Araújo, Patrícia Oliveira, Tatiane Mitiko e Maíra Pedreschi responsáveis pelas salas de Citometria de fluxo e Cultura Celular por toda a dedicação aos setores, e ajuda oferecida para que este trabalho fosse realizado.

A todos os pesquisadores e alunos do LIM56 pela troca de conversas, conhecimentos e convivência amigável.

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	8
Lista de Tabelas	11
Lista de Figuras	12
Resumo	15
Abstract.....	16
1 Introdução.....	14
1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC).....	15
1.2 DPOC e resposta imunológica	17
1.3 Exercício e resposta imunológica	23
1.4 DPOC e exercício físico	26
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. Casuística.....	30
4. Material e Métodos	32
4.1 Avaliação pré e pós-programa de reabilitação.....	32
4.2 Coleta e processamento de amostras	32
4.3 Cultura de PBMC para avaliação da proliferação de linfócitos.....	33
4.4 Análise da expressão de marcadores de apoptose.....	36
4.5 Separação Celular e Comprimento do Telômero.....	38
4.5.1 Purificação de linfócitos TCD4 ⁺	38
4.5.2 Purificação de linfócitos TCD8 ⁺	39
4.5.3 Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente com análise por citometria de fluxo (<i>Flow-FISH</i>).....	40
4.6 Fenotipagem dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ do sangue periférico	44
4.7 Dosagem de citocinas	45
4.8 Programa de reabilitação pulmonar	45
4.9 Padronização do antígeno <i>Haemophilus influenzae</i>	46
4.10 Análise estatística	47
5. Resultados.....	49
5.1 DPOC e Tabagistas sem DPOC.....	49

5.1.1 Dados clínicos e demográficos.....	49
5.1.2 Comprimento relativo do telômero	50
5.1.3 Fenotipagem de linfócitos	51
5.1.4 Dosagem de citocinas no soro	53
5.2 DPOC Pré e Pós Programa de Reabilitação.....	54
5.2.1 Dados demográficos dos pacientes com DPOC.....	54
5.2.2 Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com DPOC	55
5.2.3 Cultura de células para avaliação da linfoproliferação	56
5.2.4 Cultura de células para avaliação da apoptose	59
5.2.5 Avaliação da quantidade de citocinas no soro de pacientes pré e pós programa de reabilitação	60
6. Discussão	62
7 Limitações do estudo	73
8 Conclusões.....	74
8. Referências Bibliográficas.....	75
9. Apêndices	88

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

µg Microgramas

µl Microlitro

°C Centígrados

AIDS “Acquired Immunodeficiency Syndrome”

APC “Allophycocyanin”

APC-Cy7 “Cy7 Allophycocyanin-cyanine 7”

Bcl-2 “B cell lymphoma 2”

BD “Becton Dickinson”

BSA “Bovine Serum Albumin”

CAPPesq Comissão de Ética para Análise de projetos de pesquisa

CAT “COPD Assessment Test”

CBA “Cytometric bead array”

CD “Cluster of differentiation”

CMV Citomegalovírus

CO₂ Gás carbônico

CVF Capacidade Vital Forçada

CXCL “Motif chemokine ligand”

DNA “Deoxyribonucleic Acid”

DPOC Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EDTA “Ethylenediamine Tetraacetic Acid”

FC Frequência Cardíaca

Fg Fentograma

FITC “Fluorescein Isothiocyanate”

FMO “Fluorescence minus one”

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GM-CSF “Granulocyte – macrophage colony stimulating factor”

GOLD “Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease”

HAE *Haemophilus influenzae*

HLA “Human leukocyte antigen”

IAL Instituto Adolfo Lutz

IFN Interferon

IL Interleucina

IMC Índice de massa corpórea

IMT Instituto de Medicina Tropical

Ki67 Proteína nuclear expressa durante a mitose

Kpb Kilopares de bases

MHC “Major Histocompatibility Complex”

mL Mililitros

mM Milimolar

mMRC “Modified Medical Research Council”

NF-κB Fator Nuclear kappa B

ng Nanogramas

NK “Natural Killer”

NK-like “Natural Killer T”

NSAIDs “Nonsteroidal anti-inflammatory drugs”

NTHI “Non Typable *Haemophilus influenzae*”

O₂ Oxigênio

OMS Organização Mundial da Saúde

PBMC “Peripheral Blood Mononuclear Cell”

PBS “Phosphate Bufferd Saline”

PCR Proteína C reativa

PE “Phycoeritrin”

Pe-Cy7 “Phycoeritrin – Cyanine 7”

pg Picogramas

pH Potencial Hidrogeniônico

PHA “Phytohemagglutinin”

PMA “Phorbol 12-Myristate 13-Acetato”

PNA “Peptide Nucleic Acid”

RM Repetição máxima

RNA “Ribonucleic Acid”

ROS “Reactive Oxygen Species”

RP Reabilitação Pulmonar

RTL “Relative Telomere Length”

SF Soro Fetal

SVCAM “Soluble Adhesion Molecules”

SiCAM “Soluble Intracellular Adhesion Molecules”

TC6 Teste de Caminhada de 6 minutos

TLR “Toll Like Receptor”

TCD4+ Linfócito T auxiliar

TCD8+ Linfócito T citotóxico

T_{EMRA} “T Effector Memory cell reacquired CD45RA”

TNF “Tumor Necrose Factor”

Treg “T regulatory cell”

TTAGGG Timina Timinina Adenosina Guanine Guanine Guanine

VEF₁ Volume Expirado Forçado no 1º Segundo

VWF “Von Wildebrand Factor”

Xg Força centrífuga máxima

Lista de Tabelas

Tabela 1 Caracterização e parâmetros bioquímicos avaliados nos portadores de DPOC e tabagistas sem DPOC.	49
Tabela 2 Quantificação de citocinas por <i>Cytometric bead array</i> de alta sensibilidade no soro de pacientes com DPOC e tabagistas.	54
Tabela 3 Caracterização dos pacientes com DPOC incluídos e concluintes do programa de exercícios.	55
Tabela 4 Dados clínicos e laboratoriais do grupo de pacientes com DPOC que concluíram o programa de reabilitação.	56
Tabela 5 Dosagens séricas de citocinas no soro pré e pós-programa de reabilitação pulmonar.	61

Lista de Figuras

- Figura 1** Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo encaminhados para reabilitação pulmonar..... 30
- Figura 2** Estratégia de *Gates* para análise da linfoproliferação. (A) Sequência de dependências dos *Gates* indicada pelas setas vermelhas, as células não estavam marcadas com Ki67. (B) *Dot-plots* representativos da marcação de Ki67 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (C) *Dot-plots* da marcação de Ki67 estimulada com PHA. (D) *Dot-plots* representativos da marcação estimulada com CMV. (E) *Dot-plots* representativos da marcação na condição estimulada com HAE. 35
- Figura 3** Exemplo de experimento FMO para otimizar a identificação das células Ki67+ nas subpopulações de CD3+ (A), CD4+ (B) e CD8+ (C), o primeiro traço representa o início da marcação de acordo com o tubo sem marcação, e o segundo traço representa o início da marcação de acordo com o FMO utilizado para análise dos dados..... 36
- Figura 4** Estratégia de *Gates* para análise da avaliação da apoptose. (A) *Dot-plots* representativos da marcação de BCL-2 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (B) *Dot-plots* representativos da marcação de Caspase-3 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (C) *Dot-plots* representativos da marcação de BCL-2 estimulada com PHA. (D) *Dot-plots* representativos da marcação de Caspase-3 estimulada com PHA. 37
- Figura 5** Exemplo de experimento FMO para otimizar a identificação das células Caspase-3 + nas subpopulações de CD3+ (A), CD4+ (B) e CD8+(C) o primeiro traço representa o início da marcação de acordo com o tubo sem marcação, e o segundo traço representa o início da marcação de acordo com o FMO, que foi utilizada para análise..... 38
- Figura 6** Purificação de linfócitos TCD4+. A) Porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) Pureza da população TCD4+ pós-purificação..... 39
- Figura 7** Purificação de linfócitos TCD8+. A) Porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) Pureza dos linfócitos TCD8+ pós-purificação. 40
- Figura 8** Fórmula para o cálculo do comprimento relativo do telômero, em relação às células controle da linhagem 1301. 42

Figura 9 Avaliação do comprimento do telômero de linfócitos TCD4+ (purificados por seleção magnética) utilizando células controle 1301. A) refere-se às células hibridizadas sem a <i>probe</i> . B) refere-se às células hibridizadas com a <i>probe</i> . <i>Gates</i> eletrônicos em FITC x PI delimitam os linfócitos e células 1301 em fase G _{0/1} (ciclo que permite a determinação do comprimento do telômero por apresentar uma cópia única do DNA); FL ₃ em escala linear representando o sinal fluorescente da marcação de DNA com iodeto de propídeo; FL ₁ em escala logarítmica representando o sinal fluorescente da <i>probe</i> (PNA/FITC).....	43
Figura 10 Estratégia de <i>gates</i> para a fenotipagem dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ do sangue periférico. Subpopulações analisadas: Memória central (MC) = CCR7+CD45RA-; <i>Naive</i> (N) = CCR7+CD45RA+; Memória Efetora (ME) = CCR7-CD45RA-; Terminalmente Diferenciadas (T _{EMRA}) = CCR7-CD45RA+.....	44
Figura 11 Exemplo de experimento FMO para otimizar a delimitação das populações CD45RA+ e CCR7+.	45
Figura 12 Análise dos resultados de quatro indivíduos controles quanto a proliferação de linfócitos, para padronização das concentrações de uso do antígeno <i>H. influenzae</i>	47
Figura 13 Comprimento relativo do telômero em linfócitos T totais (CD3), linfócitos T auxiliares (CD4) e linfócitos T citotóxicos (CD8) em kilopares de base.....	50
Figura 14 A) Subpopulações de células em linfócitos T auxiliares (CD4). B) Subpopulações de células em linfócitos T citotóxicos (CD8).....	52
Figura 15 Porcentagem de células senescentes (CD28-) nas subpopulações de linfócitos TCD4+ (A) e linfócitos TCD8+ (B).....	53
Figura 16 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição sem estímulo nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8).....	57
Figura 17 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com mitógeno PHA nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.	57
Figura 18 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com CMV nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.	58

Figura 19 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com HAE nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.....	59
Figura 20 Expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Caspase-3, sem estímulo exógeno (A), e estimulada com PHA (B) nos períodos antes e depois do programa de exercícios, para as três populações de linfócitos.....	60

Resumo

Fernandes JR. *Efeito do exercício físico na resposta imune celular de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)*. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2016

Os estágios avançados da DPOC são longos e dolorosos processos onde há o aumento dos sintomas, fazendo com que o paciente entre em um ciclo vicioso de deterioração da capacidade física, dispneia, ansiedade e isolamento social. Deste modo, o exercício vem se mostrando um componente importante na DPOC, auxiliando no tratamento medicamentoso para a redução dos sintomas e melhora da qualidade de vida. Neste contexto, não há muitos relatos na literatura sobre o papel da atividade física no padrão de secreção de citocinas e na resposta proliferativa de pacientes com DPOC. Além disso, não há muita concordância sobre o comprimento do telômero e fenótipo celular quando comparados tabagistas que não desenvolvem a doença e pacientes com DPOC. O objetivo deste trabalho foi comparar alguns parâmetros imunológicos entre pacientes com DPOC e indivíduos tabagistas sem DPOC, e em pacientes com DPOC antes e após o programa de reabilitação oferecido no Hospital das Clínicas da FMUSP. As coletas de sangue foram realizadas em dois momentos para o grupo DPOC (pré e pós-programa de reabilitação pulmonar), e em um único momento para o grupo tabagista. Estas amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico, onde foram analisados os seguintes parâmetros: proliferação celular e apoptose, fenotipagem de linfócitos, comprimento relativo do telômero e dosagem de citocinas. Verificamos que indivíduos tabagistas possuem menores quantidades de proteína C reativa que pacientes com DPOC, e uma tendência a maior número de linfócitos. Além disso, o comprimento relativo do telômero em tabagistas é maior do que em pacientes com DPOC, especialmente em linfócitos TCD8+, e em menor grau em linfócitos TCD4+. Linfócitos TCD8+ de portadores de DPOC apresentaram maiores porcentagens de células terminalmente diferenciadas, sugerindo exaustão celular destes linfócitos, e menores porcentagens de células de memória central e memória efetora. Pacientes com DPOC apresentam maiores quantidades de citocinas comparados aos tabagistas sem DPOC. Já na comparação pré e pós-reabilitação verificamos menores quantidades de leucócitos, menores pontuações nos questionários de sintomas, e maiores distâncias percorridas no teste de caminhada de 6 minutos. Na avaliação da linfoproliferação, para as células estimuladas com mitógeno (fitohemaglutinina) e antígenos (citomegalovírus e *Haemophilus influenza*) foi possível verificar melhora na resposta linfoproliferativa dos pacientes no período pós-reabilitação, assim como maiores níveis da citocina imunoreguladora IL-10. Deste modo concluímos que pacientes com DPOC possuem um perfil mais pró-inflamatório e de diferenciação terminal que tabagistas sem a doença e que exercício físico é capaz de modular o ambiente inflamatório melhorando alguns parâmetros da resposta imune celular.

Descritores: doença pulmonar obstrutiva crônica; sistema imunológico; exercício; inflamação; proliferação de células; encurtamento do telômero

Abstract

Fernandes JR. Effect of physical exercise on cellular immune response of patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo”; 2016

The advanced stages of COPD are long and painful with increase of symptoms making the patients enter a vicious cycle of deterioration of physical capacity, dyspnea, anxiety and social isolation. Therefore, the exercise shows an important component of COPD pathogenesis, assisting in pharmacological treatment, reducing symptoms and enhancing life quality. In this context, there are no concise reports in literature about the role of physical activity in the pattern of cytokine secretion and proliferative response in COPD patients. Besides this, there is no consensus in the data comparing smokers with COPD and smokers without COPD. Because of this, we compared some immune parameters of smokers with COPD and smokers without COPD, and evaluated the cellular immune response before and after a rehabilitation program offered at the Hospital das Clínicas FMUSP. Blood collection was performed in two moments in the COPD group (before and after the rehabilitation program), and once in smokers without COPD. After that the samples were processed to peripheral blood mononuclear cells isolation, in which were analyzed the cellular proliferation and apoptosis, the lymphocyte phenotypic characteristics, the telomere length and the cytokines levels in serum and culture supernatants. Smokers without COPD have lower levels of C reactive protein, and a trend to greater percentages of lymphocytes than in smoker with COPD. The telomere length of COPD patients was shorter than that of smokers without COPD, especially in TCD8+ lymphocytes, with a non-significant trend in the TCD4+ lymphocytes. The TCD8+ subpopulation of COPD patients comprised greater percentages of terminally differentiated cells, and lower percentages of central memory and effector memory cells, suggesting a bias to more terminally differentiated (and eventually exhausted) cells. Moreover, the levels of pro inflammatory cytokines were greater in COPD patients. Evaluation of the exercise effect, we found greater quantities of leucocytes, lower scores in the symptoms questionnaires and longer distances in the six minute walk test after the rehabilitation program. Besides this, the proliferative response to the mitogen phytohemagglutinin, and the antigens from cytomegalovirus and nontypeable *Haemophilus influenza* were all improved after the exercise program with greater levels of secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10. In conclusion, COPD patients have a pro inflammatory profile and a bias for more terminally differentiated (and eventually exhausted) cells when compared with smokers without COPD, and that the exercise program is capable of modulating the inflammatory microenvironment enhancing some parameters of the cellular immune response.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease ; immune system; exercise; inflammation; cell proliferation; telomere shortening

1 Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma doença caracterizada pela presença de obstrução ou limitação do fluxo aéreo, que pode ser parcial ou totalmente irreversível, e possui progressão lenta. As manifestações clínicas são inespecíficas e variáveis, mas incluem principalmente dispneia, tosse e expectoração crônica. A DPOC costuma ter curso silencioso, com difícil diagnóstico nas fases iniciais (1).

Na DPOC ocorre inflamação brônquica, com edema da parede dos brônquios e redução de seu calibre, juntamente com aumento da produção de muco. A obstrução dos brônquios leva à dificuldade na condução do ar, hiperinsuflação pulmonar e dificuldade respiratória, inicialmente aos esforços físicos, podendo ser caracterizada como bronquite crônica ou enfisema pulmonar (1, 2).

Pacientes com DPOC sentem dificuldades nas suas atividades de vida diária e mesmo que em tratamento farmacológico adequado, há uma tendência ao descondicionamento físico e uma condição emocional que aumentam a morbidade. A reabilitação pulmonar é uma intervenção não farmacológica que pode otimizar a performance social e física dos pacientes (3).

No último século a população se tornou menos fisicamente ativa tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Esta mudança impactou no aumento de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurológicas e doenças pulmonares (4). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (5) para um bom status de saúde um importante componente é o estilo de vida adotado pelas pessoas, sendo a prática de atividades físicas um meio relevante de promoção da saúde e redução dos fatores de risco(6).

No entanto, o pulmão do idoso e dos indivíduos portadores de DPOC apresentam semelhanças. A inflamação presente nos dois processos (DPOC e envelhecimento) caracteriza-se pelo acúmulo de neutrófilos, ativação da NF- κ B (Fator nuclear kappa B) e aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 (Interleucina-6), IL-8 (Interleucina-8) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) (7). Além disso, evidências recentes indicam que há diminuída atividade da telomerase em células do sangue periférico de pacientes com DPOC da mesma forma que no processo de envelhecimento (8, 9).

A função imune de humanos e diversos animais diminui com o envelhecimento, sendo este comprometimento de grande importância, não somente em termos de doenças infectocontagiosas, mas também para doenças associadas ao envelhecimento (10).

A prática de exercício agudo ou crônico tem efeito sobre diversos parâmetros do sistema imunológico, sendo que o exercício crônico de intensidade moderada pode estimular componentes do sistema imune celular diminuindo o risco de infecções, enquanto o exercício agudo ou de alta intensidade pode induzir resultados opostos, diminuindo a função do sistema imune celular (11, 12).

1.1 Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A característica da DPOC é a presença de obstrução ou limitação do fluxo aéreo irreversível, relacionada a uma resposta inflamatória anormal à inalação de partículas ou gases tóxicos, comumente causada pelo tabagismo. Apesar de afetar preponderantemente os pulmões, a DPOC também tem consequências sistêmicas importantes (4).

A prevalência da DPOC tem aumentado no mundo todo devido a maior exposição aos fatores de risco como tabagismo, exposição a cádmio e sílica, e maiores índices de poluição atmosférica. Esta maior exposição agregada a maior expectativa de vida da população tornou a DPOC uma epidemia, com estimativa de se tornar a terceira maior causa de mortalidade até 2020 (13). O tabagismo e a idade são fatores de risco para que os pacientes com DPOC apresentem múltiplas comorbidades, o que contribui para a gravidade da doença (14).

Ao iniciar o hábito do fumo há lesões no aparelho respiratório, como a destruição dos cílios da mucosa respiratória, o que facilita a penetração de microrganismos e agentes tóxicos, e subsequentemente os processos infecciosos como bronquites, pneumonias e tuberculose (4). O tabagismo é a principal causa mundial de DPOC, sendo responsável por mais de 95% dos casos mundiais (15). Porém, nem todos os tabagistas desenvolvem a doença, mostrando assim a grande importância da suscetibilidade individual à DPOC, relacionada ao aumento de inflamação, liberação de proteinases e deficiência de inibidores de proteinases (8). Estimativas indicam que entre 15% a 20% dos indivíduos fumantes podem desenvolver DPOC ao longo da vida, sendo que os tabagistas suscetíveis apresentam rápido declínio de valor expiratório forçado no primeiro segundo (VEF₁) (1, 6).

As comorbidades de maior prevalência em indivíduos DPOC são osteoporose, coronariopatias, glaucoma, distúrbios do sono, síndrome metabólica, distúrbios nutricionais e depressão (8). A DPOC apresenta além de manifestações pulmonares e nas vias aéreas diversas manifestações sistêmicas como perda de peso não intencional, disfunção músculo esquelética, aumento do risco de doença cardiovascular, osteoporose e depressão, e inflamação sistêmica persistente, o que a torna uma doença sistêmica e não somente localizada(16).

Em 1998 foi criado o *Global Initiative for Chronic Obstructive Disease* (GOLD) (17) um programa com o propósito de produzir recomendações para o manejo da DPOC baseado nas melhores informações científicas disponíveis, possibilitando a criação de uma classificação. De acordo com este documento, o diagnóstico deve ser proposto em qualquer indivíduo com idade próxima ou superior aos 40 anos, com dispneia, tosse e produção de secreção, associado ao histórico de exposição a algum dos fatores de risco como tabagismo, fumaça de combustíveis, químicos e poeiras ocupacionais. O exame solicitado para diagnóstico clínico é a espirometria, sendo o VEF₁ (Volume expirado forçado no primeiro segundo) o parâmetro espirométrico mais importante, responsável por medir indiretamente o fluxo, já que reflete a quantidade de ar que pode ser expirada em uma definida quantidade de tempo (1 segundo). Já o distúrbio obstrutivo que ocorre na DPOC é caracterizado por redução dos fluxos em relação ao volume disponível, que para confirmação do diagnóstico deve apresentar valores de $VEF_1/CVF < 0.70$ pós aplicação de broncodilatador.

A DPOC além de acometer os pulmões desencadeia diversas manifestações sistêmicas relacionadas à doença como: processo inflamatório, estresse oxidativo, aumento de citocinas, disfunção muscular periférica, anorexia e desnutrição. A influência destas manifestações sistêmicas no estado geral do paciente aumenta a importância de uma abordagem multidimensional que contemple todos os componentes da doença (18).

A DPOC é a quarta causa de morte no mundo com aproximadamente 16 milhões de pessoas afetadas nos Estados Unidos, gerando um custo de 15 bilhões por ano na saúde (19). Afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, representando um problema de saúde pública, especialmente em idosos (2). Entre 9-10% de indivíduos acima de 40 anos desenvolvem DPOC, podendo alcançar 20% em alguns lugares (20).

No Brasil a mortalidade causada pela DPOC cresceu 24,3% entre 1997 e 2003, sendo em 2003 a quinta maior causa de internação no sistema público de saúde em maiores

de 40 anos com 196.698 internações e um gasto de aproximadamente 72 milhões de reais (21). De acordo com Menezes et al. (22), a prevalência da DPOC no estado de São Paulo chegou a 15,8% da população com aumento do número de óbitos decorrentes da doença, passando de 7,88 em cem mil habitantes na década de 80 para 19,04 em cem mil habitantes na década de 90.

As maiores taxas de mortalidade se encontram no grupo etário superior a 65 anos, sendo em média quatro vezes maior do que em indivíduos entre 55-64 anos. Há também uma diferença entre os gêneros, sendo o coeficiente de mortalidade 80% maior em homens. Diferenças regionais também existem, com a região Sul ocupando o primeiro lugar apresentando maiores taxas de mortalidade, seguidas da região Sudeste, sendo que as taxas são maiores nas capitais quando comparadas com o interior (23).

1.2 DPOC e resposta imunológica

A DPOC é uma complexa doença que apresenta manifestações pulmonares e extrapulmonares, com maior prevalência de comorbidades como doenças cardiovasculares, disfunções músculo - esqueléticas, osteoporose, síndrome metabólica e câncer (24, 25). Uma característica comum desta doença é o aumento na susceptibilidade a infecções respiratórias, contribuindo com a colonização pulmonar por bactérias tais como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Moraxella catarrhalis* (2). A patogênese da DPOC parece se originar a partir da desregulação da resposta imune frente a partículas tóxicas. Estas mudanças ocorrem por décadas, e muitos pacientes expressam o fenótipo da doença após a quarta década de vida, sendo assim classificada como uma doença de senescência acelerada (26-28).

Acredita-se que o mecanismo patogênico primário envolvido na DPOC é a resposta inflamatória exacerbada a partículas e gases inalados, especialmente a fumaça do cigarro, porém esta resposta não ocorre em todos os indivíduos expostos, o que demonstra um background genético da doença (24, 27). Porém outros fatores ambientais, especialmente durante a infância podem prejudicar o desenvolvimento pulmonar normal e aumentar o risco de desenvolvimento da doença (29). O nível de dependência da nicotina, o desenvolvimento pulmonar, e a predisposição inflamatória pulmonar e sistêmica podem estar envolvidas no contexto genético da doença (30).

Na DPOC ocorre uma resposta inflamatória descompensada caracterizada pela presença de células inflamatórias no parênquima pulmonar tanto do sistema imune inato,

principalmente neutrófilos e macrófagos, como do sistema imune adaptativo, representado por linfócitos TCD4+, TCD8+ e linfócitos B (31). Além disso, há ativação de células estruturais como células epiteliais e alveolares, células endoteliais e fibroblastos (32). A intensidade desta resposta do sistema imune parece estar associada ao aumento da gravidade da obstrução do fluxo das vias aéreas, porém não há estudos investigando a inflamação nestes pacientes no aspecto temporal (33).

O processo inflamatório normal aumenta a imunidade tecidual que protege contra infecções, porém na DPOC ocorre uma indução deficiente da resposta imune que contribui para infecções respiratórias intermitentes, piora do microambiente inflamatório pulmonar e gravidade da doença (31, 34).

As células epiteliais ativadas pela fumaça do cigarro e outros irritantes inalados como biomassa e fumaça de combustíveis são capazes de produzir mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF e IL-8 (35).

Estas citocinas tem principalmente função de amplificar a inflamação, comumente pela ativação de NF- κ B, o que leva a um aumento da expressão de diversos genes inflamatórios (36). O TNF- α age diretamente na musculatura lisa das vias aéreas aumentando a resposta contrátil, e se encontra especialmente aumentada no escarro de pacientes com DPOC em exacerbação (37). Porém, utilizando uma droga para bloquear TNF, não foi possível observar benefícios em sintomas, função pulmonar, e desempenho em exercício em pacientes com DPOC, o que sugere que a droga utilizada não foi capaz de neutralizar adequadamente a concentração de TNF, ou há outras citocinas mais importantes envolvidas na patogênese da doença (38).

A IL-1 β tem função de ativar macrófagos induzindo-os a secretar citocinas e quimiocinas inflamatórias que auxiliam na manutenção da inflamação (39). Em escarro, ar expirado e plasma de pacientes com DPOC em exacerbação também são encontrados altos níveis de IL-6. Esta citocina induz liberação de proteína C reativa do fígado e pode estar envolvida em algumas alterações sistêmicas da DPOC como a fraqueza muscular e a disfunção endotelial (40).

As células epiteliais são importantes na defesa das vias aéreas através da secreção de muco, antioxidantes, antiproteinases e defensinas. O cigarro e outros agentes tóxicos podem impedir esta resposta, aumentando a susceptibilidade a infecções (41).

Os macrófagos tem um importante papel em orquestrar a inflamação crônica nos pacientes com DPOC. O número de macrófagos se encontra aumentado no parênquima pulmonar, lavado bronquioalveolar, e escarro destes pacientes, apresentando uma correlação entre o número de macrófagos e a gravidade do enfisema. Estes macrófagos podem ser ativados pela fumaça do cigarro e liberar mediadores inflamatórios como TNF- α , CXCL1, CXCL8, CCL2, Leucotrieno (LT) B₄, e espécies reativas de oxigênio (ROS). Em pacientes com DPOC os macrófagos apresentam maior poder de secreção de proteínas inflamatórias, além de maior atividade elastolítica do que indivíduos tabagistas saudáveis (32, 42, 43).

Este aumento de macrófagos pode ser explicado por um aumento no recrutamento de monócitos da circulação em resposta a quimiocinas seletivas de monócitos, como CCL2 e CXCL1, levando a um aumento destas células no escarro e lavado bronquioalveolar de pacientes. Os monócitos destes pacientes demonstram uma maior resposta quimiotática quando comparados com monócitos de tabagistas saudáveis e não tabagistas (44).

Durante uma resposta inflamatória, macrófagos alveolares fagocitam infiltrados neutrofílicos com o intuito de controlar a inflamação. Em indivíduos com DPOC esta função parece estar prejudicada, já que há uma grande quantidade de macrófagos, com habilidade fagocítica diminuída quando comparados a tabagistas sem DPOC (45, 46).

Em escarro e lavado bronquioalveolar são encontrados números aumentados de neutrófilos, o que está correlacionado com a gravidade da doença. O tabagismo tem efeito direto na produção de granulócitos e na liberação destes pela medula óssea. Esta produção é possivelmente mediada pelo GM-CSF liberado pelos macrófagos do pulmão (47). Os neutrófilos de pacientes com DPOC demonstram diversas anormalidades na resposta quimiotática, como aumento da migração, mas eficiência reduzida, o que pode ser causado pela resposta quimiotática anormal dos monócitos (48).

O papel dos eosinófilos na DPOC ainda é duvidoso. Já foram descritos aumento de eosinófilos nas vias aéreas e lavado bronquioalveolar em pacientes estáveis, porém outros autores afirmam não encontrar diferenças em biópsias de vias aéreas, fluido bronquioalveolar e escarro (49). A presença de eosinófilos em pacientes com DPOC pode indicar uma melhor resposta a broncodilatadores e corticoesteróides, podendo também indicar uma síndrome de *overlap* asma-DPOC. Além disso, a presença de eosinófilos pode auxiliar na definição de um fenótipo de DPOC (50, 51). A concentração de IL-5 no escarro

está relacionada ao número de eosinófilos, estando ambos diminuídos por efeito de corticoesteróides orais (52).

Pacientes com DPOC com aumento do número de eosinófilos no sangue (>2%) demonstram redução nas exacerbações quando comparados com pacientes que possuem baixos números de eosinófilos, porém não há diferença entre a função pulmonar e sintomas destes pacientes. Durante exacerbações agudas foi encontrado aumento no número de eosinófilos em biópsia brônquica e lavado bronquioalveolar em pacientes com DPOC (53-55).

Pacientes portadores de DPOC não possuem somente a resposta inicial a patógenos debilitada, mas também a magnitude com a qual o sistema imune adaptativo responde a estes desafios se encontra prejudicada (34, 56). Esta resposta imune diminuída contribui para o aumento das ocorrências de exacerbação e infecção intermitente, principalmente causada por NTHI (*H. Influenza* não tipificável), *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumonia* (34, 57)

De acordo com Lugade et al. (58) o eixo de sinalização que relaciona o *Toll Like Receptor 2* (TRL2) com a lipoproteína bacteriana P6 é essencial na mediação de uma resposta imunológica adaptativa robusta contra NTHI. O NTHI é frequentemente encontrado nas vias aérea inferiores de pacientes com uma frequência de 25-50% em pacientes estáveis (59). Em portadores de DPOC 18% das exacerbações são causadas por *H. Influenza* (60).

Há um aumento numérico de linfócitos T, especialmente TCD8+, no parênquima pulmonar e nas vias aéreas centrais e periféricas de pacientes com DPOC (61, 62). Este aumento foi correlacionado à destruição alveolar e a gravidade da obstrução das vias aéreas. O infiltrado inflamatório nas vias aéreas dos indivíduos DPOC tem como característica o aumento dos linfócitos T CD8+ (Tc1), e em menor quantidade linfócitos T CD4+ (Th1) (33, 63). As células Th1 são descritas como aumentadas tanto no pulmão, como no lavado bronquioalveolar, e no sangue periférico de pacientes com DPOC (63-65)

Os linfócitos TCD8+ reconhecem antígenos baseado no contexto de apresentação via HLA de classe I, tendo como principal papel a atividade citotóxica para células infectadas por patógenos intracelulares (66). Além disso, o infiltrado de linfócitos TCD8+ demonstra uma característica fenotípica predominante de células de memória efetora

(CCR7-CD45RA+), especialmente relacionadas com a proliferação homeostática na ausência de antígenos (67, 68).

Os linfócitos TCD4⁺ reconhecem antígenos extracelulares apresentados por MHC de classe II que é expresso somente por células B e células dendríticas. Estes linfócitos também produzem mediadores importantes para coordenação da resposta imunológica de outros componentes celulares (69). Em pacientes com enfisema grave, os linfócitos CD4 parecem estar ativados, e produzem IFN- γ . Os níveis desta citocina se correlacionam com o grau de obstrução das vias aéreas (70, 71). O número de linfócito TCD4⁺ Th17, que secretam IL-17A e IL-22 também se encontra aumentado nas vias aéreas de pacientes com DPOC. Estas células parecem estar envolvidas em orquestrar a inflamação neutrofílica, e são reguladas pela IL-6 e IL-23 secretadas por macrófagos alveolares (72, 73). No sangue periférico estas células Th17 também se encontram aumentadas em indivíduos com DPOC quando comparados com fumantes sem DPOC e indivíduos saudáveis, e além deste subtipo celular, as células Th2, produtoras de IL-4, e as células T reguladoras também se encontram em níveis mais altos quando comparados com indivíduos saudáveis (74). Porém Solleiro-Villavicencio et al. descrevem que as células Th17 estão aumentadas principalmente em indivíduos com DPOC causada pelo tabagismo, incluindo altos níveis de IL-6 no soro destes indivíduos, enquanto em indivíduos com DPOC causada por exposição a biomassa, células Th2 parecem ser as mais envolvidas na patogênese da doença.

Nas vias aéreas há um aumento de apoptose que pode ter papel importante na DPOC (75). A apoptose nas células epiteliais pulmonares se encontra aumentada, estando neste processo mais envolvidas as moléculas p53, e caspase-8 (76). No soro de pacientes com DPOC há a diminuição e proteínas sFASL e p53 comparada a indivíduos controles, porém não há diferença na expressão de Bcl-2 e Caspase-9 nestes pacientes (77). Assim como no escarro há uma diminuição da apoptose em pacientes com DPOC, mas também em tabagistas saudáveis (78). O uso de corticoides inalatórios pode modular as células, tornando-as mais propensas a apoptose, com significativa diminuição da molécula Bcl-2 e IL-7 (75).

Sugere-se que o declínio da função do sistema imune dos indivíduos com DPOC seja patógeno específico, apresentando resposta proliferativa normal a antígenos inespecíficos (19). Deste modo, ao avaliar a funcionalidade das células T reguladoras (Tregs) Kalathil et al. (79) verificaram que esta resposta imune falha pode ser atribuída a

um efeito de rede com função aumentada de células Tregs e diminuída de células T efectoras. Em outros estudos, também foram encontrados níveis mais altos de células T reguladoras, em indivíduos com DPOC (74), não existindo diferença entre o número de células TRegs em indivíduos com DPOC causada por tabagismo e por exposição a biomassa (64)

De acordo com Fattouh, El-din e Alkady (80) a frequência de células *Natural Killers* (NK) (CD3-CD56+) e *NKT-like* (CD3+CD56+) estão significativamente aumentadas em pacientes com DPOC comparados com saudáveis. Além disso, podem estar envolvidas na patogênese da doença já que os danos observados no tecido pulmonar podem ser causados diretamente pela atividade citotóxica das perforinas e granzimas.

Linfócitos TCD8+ podem causar apoptose e citólise de células epiteliais alveolares através da secreção de perforinas, granzimas e TNF- α , estando associados aos danos do enfisema (81). Há evidências da senescência imunológica em pacientes com DPOC constatadas através da não expressão da molécula CD28, molécula co-estimuladora de linfócitos T. As células senescentes (CD8+CD28-) secretam grandes quantidades de perforinas e granzimas B (82).

Existem muitas semelhanças entre o processo de envelhecimento e na DPOC, principalmente no sistema imunológico, sugerindo que a DPOC apresente um fenótipo de senescência acelerada(28). Diversos marcadores de envelhecimento são investigados na DPOC, como por exemplo o encurtamento dos telômeros(83). Telômeros são estruturas protetoras que estabilizam o final dos cromossomos preservando a informação e prevenindo a degradação de DNA (84, 85). O encurtamento destas estruturas ocorre naturalmente com a divisão celular, e muitas vezes pode indicar um sinal para apoptose (86). A redução esperada nas células do sangue periférico é de 82kbp por ano, acompanhada da diminuição da atividade da telomerase (87). Em pacientes com DPOC há encurtamento do telômero nos leucócitos, gerando um fator de risco para senescência replicativa(83). Além disso, os telômeros estão relacionados a diminuição da função pulmonar(88).

Há ainda outro mecanismo sugerido na patogênese da DPOC, a autoimunidade. Nestes indivíduos a fumaça do cigarro pode danificar o interstício pulmonar e a estrutura celular, dando a essas um potencial antigênico. Além disso, o estresse oxidativo leva à formação de proteínas carboniladas que também possuem potencial antigênico, sendo que anticorpos específicos para estas moléculas já foram encontrados na circulação de pacientes com DPOC(89).

Na DPOC há uma necessidade de um fino balanço entre a resposta inflamatória, que elimina os patógenos, porém, danifica o tecido, e a função das células e citocinas imunossupressoras, que atenuam a resposta pró-inflamatória, mas diminuem a imunidade antibacteriana. Este *feedback* imunossupressor pode ser um importante alvo na gestão da DPOC, necessitando de maiores estudos para o melhor entendimento do mecanismo envolvido e seu papel na patogênese da doença (90).

1.3 Exercício e resposta imunológica

No início da década de 70 ocorreu um aumento de trabalhos relacionando exercício e sistema imunológico, permitindo assim investigações fundamentais nesta área como no estudo de infecções de vias aéreas em atletas de alto padrão(12)(12). Deste modo, o exercício pode ter efeitos positivos e negativos na função imune e suscetibilidade à doenças, sendo a relação entre exercício e suscetibilidade a infecções moldada em formato de uma curva jota, sugerindo que enquanto uma atividade moderada melhora a função imune acima dos níveis inativos, o exercício prolongado e de alta intensidade pode prejudicar a função imune (15, 91).

Apesar da resposta do sistema imunológico ser uma área extensamente pesquisada, grande parte dos resultados obtidos diz respeito sobre o exercício físico agudo, mostrando uma resposta transitória e variável, influenciada por diversos fatores como intensidade do exercício, duração e modo do exercício, concentração hormonal durante o exercício, mudança de temperatura, fluxo sanguíneo e hidratação. No sangue são passíveis de serem verificadas: leucocitose, granulocitose, diminuídas proporções de linfócitos T e B. Nas subpopulações de linfócitos há diminuição de células auxiliares e supressoras, e um aumento de células *Natural Killer* (NK) (92, 93).

No exercício agudo há um aumento de neutrófilos durante o exercício que se mantêm no período pós-exercício. Já os linfócitos, aumentam durante o exercício e tendem a diminuir após o exercício intenso de longa duração, porém no exercício moderado a recuperação dos níveis normais de linfócitos é mais rápida. No exercício crônico a imunidade adaptativa se mostra pouco afetada, sendo as principais mudanças a melhora da função das células *Natural Killer* (NK) e a supressão dos neutrófilos (94).

Além disso, exercícios prolongados podem levar a menores níveis séricos e salivares de imunoglobulinas, sendo confirmado pela maior prevalência de infecções

respiratórias em maratonistas no período de 3-72 horas, ou até duas semanas após a competição (95, 96).

Em atletas de elite é possível verificar que corridas de *endurance* e *overtraining* geram menor resistência a infecções de trato respiratório superior, estudos epidemiológicos mostram que estas infecções se elevam durante treinos pesados e entre uma e duas semanas após a participação de corridas de *endurance* (2, 97). Estudos em animais também corroboram com a ideia de que o exercício exaustivo por um ou dois períodos, seguidos de inoculação de agente infeccioso, leva a uma maior frequência de infecção (21, 98).

O exercício moderado estimula o sistema imune e pode ser responsável pela diminuição de doenças entre os praticantes, enquanto o exercício intenso induz imunossupressão no período de recuperação explicando aumento do risco de infecção em atletas (94).

A inatividade física em idosos pode levar a uma migração prejudicada de neutrófilos, relacionada à inflamação sistêmica, ou redução de expressão de receptores de quimiocinas, há também uma correlação com os níveis de adiponectina sugerindo uma influência deste hormônio (99).

Durante o exercício há o recrutamento dos leucócitos para o sangue periférico o que resulta no aumento da concentração de neutrófilos, linfócitos e monócitos. No exercício moderado há pequenos efeitos sobre o sistema imune em populações saudáveis, mas em outras populações como, por exemplo, em idosos pode ocorrer uma influência benéfica na função imunológica (10). A regularidade do exercício combinada com outros métodos como a dieta pode ser benéfica para o sistema imunológico de idosos. Além disso, o exercício muda a composição corporal e o metabolismo de lipídios podendo resultar na menor atividade inflamatória (100).

A prática do exercício físico aumenta o consumo de oxigênio o que favorece a geração de espécies reativas de oxigênio. No entanto, durante o exercício moderado há um aumento da produção de antioxidantes como a superóxido dismutase e a catalase (10), moléculas particularmente importantes para a manutenção de espécies reativas de oxigênio intracelulares, produzidas pelo metabolismo oxidativo (101).

Em mulheres altamente condicionadas, entre 65 e 84 anos, foram descritos aumento da citotoxicidade das células NK e da resposta proliferativa à Fitohemaglutinina (PHA)

(102). Schmid et al. (103) descreveram em corredores recreacionais, que treinavam por volta de 50 minutos por dia, aumento da resposta proliferativa à mitógenos e maior produção de IL-2, IFN- γ e IL-4, quando comparados aos sedentários e jovens.

Woods et al. (104) descreveram que após 6 meses de exercício aplicados em indivíduos sedentários não ocorreram alterações significativas nas células T e NK, porém houve uma tendência a maiores respostas proliferativas a concanavalina A nos indivíduos treinados. Em treinamento de *endurance* quando a proliferação é estudada baseada em células T não há efeito do exercício sobre a resposta destas células (105).

Em resultados prévios de nosso grupo de pesquisa comparando idosos treinados intensamente, treinados moderadamente e não treinados foi possível verificar que na população de células CD4⁺ há menor quantidade de células *naive* e maior quantidade de células de memória central (MC) no grupo treinado moderadamente comparado aos outros dois grupos. Além disso, ainda nesta população de linfócitos foi verificado maior quantidade de células terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) no grupo não treinado. Na população de linfócitos CD8⁺ descreveu-se uma maior porcentagem de células de memória efetora nos indivíduos treinados intensamente do que nos demais grupos, enquanto no grupo não treinado houve maior porcentagem de células terminalmente diferenciadas (106).

Em trabalhos publicados encontram-se dados de que a atividade física aeróbica regular está associada a um menor declínio da função de células T, já que idosos ativos possuem uma maior resposta proliferativa à mitógenos (PHA e Pokeweed), além de produção maior de citocinas como IL-2, IFN- γ e IL-4 (107). Em idosos que praticavam caminhadas foi descrito aumento de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ e TCD8⁺ produtoras de IL-2 quando estimuladas com PMA e ionomicina (108). Em programa intervencionista com duração de dois anos também foi verificado um aumento de células T produtoras de IL-2 em idosos submetidas a atividade física moderada (109).

Após um treinamento de 6 meses, os idosos treinados apresentaram um aumento na expressão da molécula CD28 em células TCD4⁺, além do aumento de células TCD4⁺IFN- γ ⁺, mas não nas células TCD4⁺IL-4⁺, comparadas com idosos inativos (110).

Diversos estudos mostram que o exercício regular aumenta a competência imunológica e reduz o risco de infecções quando comparado ao estilo de vida sedentário.

A regularidade do exercício é uma medida contra a inflamação sistêmica persistente ocasionada em doenças cardiovasculares e metabólicas. Os efeitos da atividade física no sistema imune dependem do modo e intensidade do exercício ou treinamento realizado. Entretanto o conhecimento acumulado demonstra a significância do exercício como um importante estilo de vida para prevenção e terapia da maioria das doenças crônicas (111).

1.4 DPOC e exercício físico

Outra característica da DPOC além da obstrução das vias aéreas é o descondicionamento e inatividade física, sendo a disfunção muscular esquelética uma das mais importantes manifestações extrapulmonares da doença. A disfunção muscular está associada à diminuição da capacidade de exercício, dispneia, levando ao descondicionamento físico do paciente (112, 113).

Em estudos anteriores pacientes austríacos com DPOC mostraram níveis de atividade física diária significativamente menores do que pacientes com DPOC brasileiros. Esta diferença parece ser influenciada por fatores étnicos e socioeconômicos (114).

De acordo com Hernandez et al. (115) pacientes com DPOC brasileiros se apresentam menos ativos em suas atividades de vida diária quando comparados com idosos brasileiros saudáveis e tendem a caminhar com menor intensidade de movimento.

Entre as alternativas para o tratamento da DPOC intervenções não farmacológicas como a reabilitação pulmonar, auxiliam juntamente com o tratamento farmacológico na redução da dispneia, aumento da qualidade de vida, tolerância ao exercício, melhorando também a capacidade cardiovascular e treinando a musculatura esquelética (8, 15).

A reabilitação pulmonar é uma intervenção multiprofissional ampla para pacientes com doenças pulmonares crônicas que demonstram sintomas e alterações nas atividades de vida diária (8).

Na reabilitação pulmonar o exercício é a parte central, com objetivo de melhorar a função muscular levando ao ganho de capacidade funcional, melhorando a capacidade oxidativa e a eficiência da musculatura esquelética, o que reduz a requisição ventilatória, diminuindo a hiperinsuflação pulmonar e a dispneia. O exercício de resistência aumenta a massa e força muscular, e o exercício aeróbico condiciona os músculos de caminhada melhorando o condicionamento cardiorrespiratório permitindo o aumento de atividade física (116).

De acordo com Sobrinho et al. (117) pacientes que completam programas de reabilitação exibem diferenças significativas nos sintomas de tosse e expectoração. Além disso, segundo Falschlehner et al. (118) há também mudanças clínicas relevantes no CAT (*COPD Assessment Test*), com redução de sintomas e melhora da classificação GOLD. Jesulic et al. (119) afirmam que o exercício é um importante fator na estabilização de efeitos alcançados na reabilitação pulmonar especialmente em relação a dispneia e qualidade de vida. Priori et al. (120) descrevem que a reabilitação pulmonar auxilia o paciente DPOC a melhorar sua capacidade de exercício, porém, fatores psicossociais podem contribuir ainda mais para a perda de atividade física após o término do programa de exercícios.

Quando comparados com indivíduos saudáveis de mesma idade, pacientes com DPOC alcançam semelhante melhora de desempenho físico, chegando a obter 50% do resultado de indivíduos saudáveis (121).

Dourado et al. (122) testaram três tipos de programas de exercício e verificaram que um programa de baixa intensidade combinado com treino de força produziu melhora significativa na força muscular, tolerância ao exercício e qualidade de vida nestes pacientes.

Como pacientes com DPOC possuem sinais de inflamação sistêmica, altos níveis de catecolaminas, e desgaste muscular mesmo em repouso, espera-se que a atividade física gere um aumento destes mediadores (123, 124). Em exercício moderado ocorreu o aumento de níveis plasmáticos de TNF- α (125) e uma indução de estresse oxidativo sistêmico e muscular nestes pacientes (126, 127).

De acordo com o trabalho de van Helvoort et al. (128) em repouso, pacientes com DPOC apresentam níveis elevados de leucócitos, monócitos, neutrófilos e proteína C reativa quando comparados a indivíduos saudáveis. Após o exercício o aumento destes parâmetros, principalmente linfócitos, foi maior nos pacientes com DPOC do que em indivíduos saudáveis, ocorrendo uma queda após 30 minutos e 1 hora do exercício, porém após 2 horas de exercício esse nível de linfócitos torna a aumentar nos pacientes com DPOC.

Os níveis aumentados de fibrinogênio, adiponectina, IL-6, e proteína C reativa nos pacientes com DPOC podem estar relacionados com a tolerância ao exercício, taxa de exacerbação e mortalidade (129-131).

No trabalho de Holz et al. (132) em repouso os pacientes com DPOC já exibiam níveis altos de IL-6, PCR, sVCAM1, sICAM1 e VWF. Após o exercício aeróbico de carga constante, indivíduos fumantes sem DPOC apresentaram um aumento de IL-6 (uma citocina pró-inflamatória e miocina com efeito anti-inflamatório), e proteína C reativa (uma proteína de fase aguda com efeito pro- inflamatório), porém os níveis de mieloperoxidase (produto de espécies reativas de oxigênio) diminuiu nestes pacientes. As alterações pós-exercício foram iguais nos pacientes com DPOC, porém em menores níveis, já que a duração do exercício neste grupo foi menor devido ao comprometimento pulmonar.

Os estágios avançados da DPOC são longos e dolorosos processos onde há o aumento dos sintomas, fazendo com que o paciente entre em um ciclo vicioso de deterioração da capacidade física, dispneia, ansiedade e isolamento social. Deste modo, o exercício vem se mostrando um componente importante na patogênese da DPOC, auxiliando no tratamento medicamentoso para a redução dos sintomas e melhora da qualidade de vida. Neste contexto, não há relatos concisos na literatura sobre o papel da atividade física no padrão de secreção de citocinas e na resposta proliferativa de pacientes com DPOC. Além disso, não há muita concordância de dados quanto a comparações entre tabagistas que não desenvolvem a doença e pacientes com DPOC quanto ao encurtamento do telômero em subpopulações específicas da imunidade adaptativa, como TCD4⁺ e TCD8⁺, e o perfil fenotípico deste linfócitos em ambos os grupos.

Por fim, o desenvolvimento de novos estudos que procurem auxiliar na compreensão dos mecanismos básicos da disfunção imune e do efeito da atividade física são de grande importância médica e de saúde pública, já que o exercício é uma intervenção não invasiva e não medicamentosa que pode auxiliar na melhora da resposta imune, que por sua vez estaria associada a menor risco infecções recorrentes, episódios de exacerbação e hospitalizações nestes pacientes, e menores custos para o sistema de saúde.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Comparar parâmetros imunológicos de pacientes com DPOC com tabagistas sem DPOC, e avaliar alguns destes parâmetros em pacientes com DPOC antes e após programa de reabilitação (RP) oferecido no Hospital das Clínicas da FMUSP.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o comprimento relativo do telômero de linfócitos TCD3+, TCD4+ e TCD8+ entre pacientes com DPOC ex- tabagistas e tabagistas ativos sem DPOC.
- Verificar a divisão de fenótipos (*naïve*, memória central, memória efetora e terminalmente diferenciadas) dos linfócitos T de pacientes com DPOC ex-tabagistas e tabagistas ativos sem DPOC por imunofenotipagem.
- Avaliar citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes com DPOC e tabagistas sem DPOC.
- Avaliar em pacientes com DPOC a resposta proliferativa de linfócitos TCD3+, TCD4+ e TCD8+ a estímulo mitogênico e antigênico através da expressão de Ki-67 pré e pós-programa de reabilitação.
- Avaliar em pacientes com DPOC a expressão de Caspase-3 e Bcl-2 em linfócitos TCD3+, TCD4+ e TCD8+ pré e pós-programa de reabilitação.
- Avaliar em pacientes com DPOC citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes pré e pós-programa de reabilitação.

3. Casuística

Foram incluídos neste estudo 23 indivíduos idosos de ambos os gêneros, na faixa etária de 60 a 80 anos, ex-tabagistas ou expostos a biomassa há pelo menos 1 ano, diagnosticados com DPOC causada por exposição a tabaco ou biomassa, em acompanhamento no Ambulatório de Doenças Obstrutivas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e encaminhados para o Programa de Exercícios (Reabilitação) no Ambulatório de Reabilitação do serviço de Fisioterapia do Hospital das Clínicas (Figura 1), todos os pacientes faziam uso de corticoesteróides inalatórios e/ou broncodilatadores de longa e curta duração. Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentaram comorbidades de impacto para o sistema imunológico (AIDS, mieloma, artrite reumatoide etc.) e/ou que fizeram uso de medicamentos imunossupressores, possuírem neoplasias, diabetes descompensada, e O₂ dependentes nas atividades de vida diária, ou ainda que relataram episódios de exacerbação, caracterizado por aumento da queixa de sintomas com ida ao pronto atendimento acompanhada de mudança de medicação, nos últimos 30 dias. Dos indivíduos recrutados dois possuíam DPOC por exposição a carvão e lenha (biomassa), e 21 possuíam DPOC por exposição ao tabaco. As amostras de sangue foram coletadas antes da primeira sessão de avaliação dos pacientes, e após a última sessão de avaliação dos pacientes, tendo esta última coleta 1 hora de intervalo do exercício para evitar mudanças agudas causadas pelo treinamento.

Figura 1 Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo encaminhados para reabilitação pulmonar.

Um segundo grupo foi composto de 17 idosos de ambos os gêneros, na faixa etária de 60 a 80 anos, fumantes ativos com carga tabágica semelhante ao grupo de pacientes com DPOC, sem prova de função pulmonar sugestiva de diagnóstico de DPOC. Os indivíduos incluídos neste grupo foram recrutados no início do Programa de Cessação de Tabagismo do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, ou foram indicados por funcionários do laboratório de pesquisa. Foram incluídos no estudo indivíduos idosos portadores de comorbidades e/ou em tratamentos destas, porém sem repercussão significativa para o sistema imunológico (ex. hipertensão controlada, diabetes controlada, e/ou que fizeram uso de medicamentos anti-inflamatórios não-esteróides – ex. NSAIDS).

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP e aprovado pela mesma, CAPPesq nº 780.843/14. Foram obtidos os consentimentos informados de todos os participantes do estudo.

4. Material e Métodos

4.1 Avaliação pré e pós-programa de reabilitação

Ambos os grupos tiveram sua condição sintomática avaliada através do questionário CAT (133) avaliando o impacto da doença no status de saúde e da escala *Modified Medical Research Council* (mMRC) (17) que avalia o nível de dispneia do paciente. Ambas as ferramentas foram aplicadas em dois momentos para o grupo DPOC (pré e pós-programa) e em um único momento para o grupo tabagista ativo. Em ambos os grupos foi verificado o histórico de tabagismo, e então calculada a carga tabágica em maços X ano para cada indivíduo. Complementarmente, foram avaliados os parâmetros laboratoriais: hemograma e proteína C reativa, realizados na Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e ambos os grupos foram submetidos à espirometria.

Além disso, para o grupo reabilitação, o teste de capacidade física para avaliar a resposta ao treinamento, mais comumente utilizado na prática clínica é o teste de caminhada de 6 minutos (TC6), o teste consiste em instruir o paciente a andar o mais rápido possível em um percurso com distância delimitada durante 6 minutos, demonstrando ao final do tempo distância percorrida(135). É de fácil execução, bem tolerado pelos pacientes, e melhor reflete as atividades de vida diária. (136).

4.2 Coleta e processamento de amostras

As coletas foram realizadas em dois momentos para o grupo DPOC (pré e pós-programa de reabilitação), e em um único momento para o grupo tabagista. Foram coletados 50 mL de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo, em tubo estéril contendo heparina como anticoagulante. As amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (*PBMC – peripheral blood mononuclear cells*) utilizando o método de gradiente de densidade Ficoll® Paque Plus (*GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom*). Para tanto, as amostras foram diluídas com solução salina isotônica (0,9% NaCl) em proporção 1:1, e o sangue total diluído foi cuidadosamente vertido pelas paredes do tubo sobre o *Ficoll-Paque* (10mL), sem homogeneização do tubo. O tubo foi centrifugado a 500 xg durante 20 minutos, com a utilização do freio três (*Beckman Model J-6B centrifuge, USA*). O anel de células mononucleares foi recolhido e as células foram lavadas em solução salina por duas vezes,

removendo-se o sobrenadante após centrifugação em velocidade de 100 xg (*Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha*) por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas com um mL de meio de cultura RPMI 1640 (*GIBCO, Massachusetts, United States*) enriquecido com 10% de soro AB humano (*Sigma, Steinheim, Alemanha*). A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, usando o campo central para contagem. A viabilidade celular foi realizada pela adição de Azul de Trypan (*Sigma, Steinheim, Alemanha*), considerando a viabilidade celular mínima aceitável acima de 90%.

4.3 Cultura de PBMC para avaliação da proliferação de linfócitos

A proliferação dos linfócitos frente à estimulação foi determinada a partir da positividade para a marcação intracelular da proteína nuclear Ki67, a qual participa da regulação da divisão celular, e pode avaliar de maneira confiável a proliferação *in vitro* (102). Assim, a suspensão de PBMCs, obtida pelo gradiente Ficoll® Paque Plus de sangue periférico heparinizado, foi cultivada em placas de 96 alvéolos (*Costar, USA*) em volume de 300µl, contendo 4×10^5 de células por poço, em meio RPMI 1640, enriquecido a 10% de soro AB humano, e suplementado de gentamicina (10 µg/mL, *Novafarma, SP, BR*). Estas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ por períodos de três dias para o estímulo com Fitohemaglutinina (PHA, 2,5 µg/mL; *Gibco BRL, NY, USA*), *Haemophilus influenzae* (HAE, 20,25 e 30µg/mL, *preparado pelo laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – IAL SP*), e seis dias para o estímulo com Citomegalovírus 400 ng/mL (CMV na diluição 1:100, *preparado pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP - IMT-USP*). Ao término do período de incubação as PBMCs foram marcadas utilizando o kit comercial de fixação e permeabilização BD Cytofix/Cytoperm™ (Cat. Nº 554714, *BD Biosciences, EUA*), seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, as células foram coletadas e transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL, e centrifugadas a 250 xg (*HermLe Z200 M/H, Alemanha*) por cinco minutos. Após a centrifugação desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos as células com 100 µl de PBS contendo 0,1µl do marcador Live/Dead® (*Fixable Red Dead Cell stain kit Cat nº L23102, Invitrogen™, Life Technologies, USA*), incubando ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30 minutos. Ao término do período de incubação as células foram lavadas duas vezes com tampão de marcação (*Phosphate-buffered saline [PBS], 1% soro*

*fetal bovino [SFB], 0,09% de azida sódica, pH 7,4 – 7,6) centrifugando a 250 x g por cinco minutos. As células foram ressuspensas em 50 µl de tampão de marcação contendo 2µl do anticorpo anti-CD3 marcado com BD Horizon V500 (BD Biosciences, EUA), 2µl do anticorpo anti-CD8 marcado com APC-Cy7 (BD Biosciences, EUA), e foram incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 30 minutos. Ao término do período de incubação as células foram lavadas duas vezes, novamente, e ressuspensas com 250 µl da solução Fixation/Permeabilization™ (BD Biosciences, EUA) e incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos. Ao término do período de incubação as células foram lavadas duas vezes com BD Perm/Wash™ (BD Biosciences, EUA) centrifugando a 250 x g por cinco minutos. As células foram ressuspensas em 50 µl de BD Perm/Wash™ contendo 2µl do anticorpo anti-CD4 marcado com BD Horizon V450 (BD Biosciences) e 7 µl do anticorpo anti-Ki67 marcado com FITC (BD Biosciences, EUA) e foram incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 30 minutos. Ao término do período de incubação as células foram lavadas duas vezes, novamente, com BD Perm/Wash™ (centrifugando a 250 x g) por cinco minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em tampão de marcação e paraformaldeído 1%. A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, no citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 10.0 seguindo a estratégia de *gates* demonstrada na Figura 1. Na condição onde as células foram estimuladas, para todos os estímulos utilizados foi realizado Delta da porcentagem de Ki67, subtraindo o valor do parâmetro sem estímulo (basal) do valor do parâmetro estimulado (PHA, CMV, HAE).*

Figura 2 Estratégia de *Gates* para análise da linfoproliferação. (A) Sequência de dependências dos *Gates* indicada pelas setas vermelhas, as células não estavam marcadas com Ki67. (B) *Dot-plots* representativos da marcação de Ki67 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (C) *Dot-plots* da marcação de Ki67 estimulada com PHA. (D) *Dot-plots* representativos da marcação estimulada com CMV. (E) *Dot-plots* representativos da marcação na condição estimulada com HAE.

Para separar corretamente as populações, auxiliando na precisão da porcentagem de células fluorescentes foi utilizada a técnica de *Fluorescence minus one* (FMO), que consiste em um tubo com a marcação de todos os anticorpos exceto o de interesse para determinada análise (neste caso Ki-67) (137), como demonstrado na figura 2.

Figura 3 Exemplo de experimento FMO para otimizar a identificação das células Ki67+ nas subpopulações de CD3+ (A), CD4+ (B) e CD8+ (C), o primeiro traço representa o início da marcação de acordo com o tubo sem marcação, e o segundo traço representa o início da marcação de acordo com o FMO utilizado para análise dos dados.

4.4 Análise da expressão de marcadores de apoptose

A avaliação da apoptose *in vitro* foi realizada nas subpopulações de linfócitos sem estimulação e após estimulação com PHA. As células obtidas de acordo com o item 4.2 foram cultivadas e marcadas de acordo com o item 4.3, com os respectivos anticorpos: anti-CD3 marcado com BD Horizon V500, anti-CD4 marcado com BD Horizon V450, anti-CD8 marcado com APC-Cy7, anticorpo anti-caspase 3 marcada com PE (*BD Biosciences*) e o anticorpo monoclonal purificado de camundongo anti-humano Bcl-2 marcado com FITC (*BD Biosciences*). A aquisição dos dados foi realizada por citometria

de fluxo, em citômetro LSRFortessa™ com os dados analisados através do Software FlowJo versão 10.0, seguindo a estratégia de *gates* demonstrada na Figura 3.

Figura 4 Estratégia de *Gates* para análise da avaliação da apoptose. (A) *Dot-plots* representativos da marcação de BCL-2 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (B) *Dot-plots* representativos da marcação de Caspase-3 para TCD3+, TCD4+ e TCD8+ na condição sem estímulo (basal). (C) *Dot-plots* representativos da marcação de BCL-2 estimulada com PHA. (D) *Dot-plots* representativos da marcação de Caspase-3 estimulada com PHA.

Assim como para a proliferação de linfócitos, nos ensaios de apoptose também foi realizado o ensaio de *Fluorescence minus one* (FMO) para definir as populações marcadas com Caspase-3 e Bcl-2, como mostra a figura 4.

Figura 5 Exemplo de experimento FMO para otimizar a identificação das células Caspase-3 + nas subpopulações de CD3+ (A), CD4+ (B) e CD8+(C) o primeiro traço representa o início da marcação de acordo com o tubo sem marcação, e o segundo traço representa o início da marcação de acordo com o FMO, que foi utilizada para análise.

4.5 Separação Celular e Comprimento do Telômero

4.5.1 Purificação de linfócitos TCD4⁺

A partir das PBMCs purificamos os linfócitos TCD4⁺ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD4 (CD4⁺ T Cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec, Alemanha) de acordo com a instrução do fabricante. Resumidamente, as células mononucleares foram marcadas indiretamente utilizando-se o coquetel Biotin na concentração de 10µl para cada 10⁷ células (composto por anticorpos monoclonais anti-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ e *Glycophorin A*), incubadas por 10 minutos a 4-8°C e posteriormente marcadas com o Anti-Biotin na concentração de 20µl para cada 10⁷ células (composto por anti-anticorpos monoclonais conjugados com microesferas magnéticas). Após lavagem em centrifugação

de 300 x g (*Centrifuge 5810R*, *Eppendorf*, Alemanha) por 10 minutos com solução tampão (*PBS + 0,5% BSA + 2Mm EDTA*), as células foram acondicionadas em coluna magnética (LD, *Milteny Biotec*, Alemanha), ocorrendo a depleção das células magneticamente marcadas. A pureza destas células foi avaliada empregando-se citometria de fluxo com três cores (CD3/CD4/CD8; *Serotec*, *Oxford, United Kingdom*), foi considerado como grau mínimo de pureza 90% (Figura 5).

Figura 6 Purificação de linfócitos TCD4+. A) Porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) Pureza da população TCD4+ pós-purificação.

4.5.2 Purificação de linfócitos TCD8+

A partir das PBMC's purificamos os linfócitos TCD8⁺ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD8 (*CD8+ T Cell Isolation Kit human*, *Miltenyi Biotec*) de acordo com a instrução do fabricante. Resumidamente, as células mononucleares foram marcadas indiretamente utilizando-se o coquetel Biotin na concentração de 10 μ l para cada 10⁷ células (composto por anticorpos monoclonais anti-CD4, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ e *Glycophorin A*), incubadas por 10 minutos a 2-8°C e posteriormente marcadas com o Anti-Biotin na concentração de 20 μ l para cada 10⁷ células (composto por anti-anticorpos monoclonais conjugados com microesferas magnéticas). Após lavagem com centrifugação de 300 x g por 10 minutos com solução tampão (*PBS + 0,5% BSA + 2 Mm EDTA*), as células foram

acondicionadas em coluna magnética (LS, *Milteny Biotec*), ocorrendo à depleção das células magneticamente marcadas. A pureza destas células foi avaliada empregando-se citometria de fluxo com três cores (CD3/CD4/CD8) e foi considerado como grau mínimo de pureza 90% (Figura 6).

Figura 7 Purificação de linfócitos TCD8+. A) Porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) Pureza dos linfócitos TCD8+ pós-purificação.

4.5.3 Hibridização *in situ* Fluorescente com análise por citometria de fluxo (*Flow-FISH*)

Para medir do comprimento dos telômeros vários métodos são disponíveis, incluindo desde a análise por *Southern Blotting*, até métodos recentes utilizando PCR (reação em cadeia da polimerase), cada um contendo vantagens e desvantagens (100). Batliwalla e colaboradores (10) e Rufer e colaboradores (138), descreveram um método quantitativo de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), empregando citometria de fluxo (*Flow-FISH*). Esta técnica possui vantagens quando comparadas com as já existentes, além de ser considerado um método confiável (103, 139). Baseia-se na utilização de uma sonda de ácido peptídico nucleico (PNA, polímero análogo ao DNA/RNA), específica para a sequência telomérica, conjugada a um fluorocromo, onde se verifica que a intensidade de fluorescência das células está diretamente relacionada ao comprimento de seus telômeros.

O procedimento tem como princípio a utilização de células em suspensão que deverão ser adicionadas a uma solução de hibridização (contendo, dentre outros reagentes, uma sonda específica para o telômero FITC-PNA (C₃TA₂)₃, que possui sequências de nucleotídeos complementares, desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar, submetidas à aquecimento a 80°C em solução de formamida (para que ocorra a desnaturação do DNA cromossômico) e hibridizadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz (nesta etapa, ocorrerá ligação da sonda na região alvo do cromossomo). Após o procedimento, a análise deverá ser realizada por citometria de fluxo, para obtenção de dados que poderão ser utilizados para determinação do comprimento dos telômeros.

Em nosso estudo a hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*) foi realizada com o emprego do *Telomere PNA Kit/FITC* (DAKO, CO, Reino Unido), sendo seguidas as instruções do fabricante. Resumidamente, para cada amostra dos indivíduos estudados, os linfócitos foram obtidos conforme item 4.4.1 e 4.4.2, e divididos em dois tubos eppendorfs (A e B) de 1,5 mL na concentração de 1x 10⁶ células, a cada tubo foram adicionadas na concentração de 1x 10⁶ células de linhagem tumoral 1301. Tais células são utilizadas como controle interno da técnica, são tetraploides, possuem telômeros longos de tamanho conhecido. Estas células foram mantidas em cultura celular contendo meio RPMI 1640 (contendo antibióticos e 10% de SFB) e congeladas em alíquotas de 5x10⁶ células por tubo, para serem utilizadas no ensaio. Os tubos foram centrifugados a 500 x g (*Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha*) por cinco minutos e o sobrenadante foi desprezado, as células do tubo A (controle negativo) foram ressuspensas em uma solução de hibridização contendo 70% de formamida e as células do tubo B foram ressuspensas em uma solução de hibridização contendo 70% de formamida mais a *probe* (sonda) específica para o telômero FITC-PNA (C₃TA₂)₃. As amostras foram aquecidas a 82°C por 10 minutos para denaturação, seguida de hibridização a temperatura ambiente ao abrigo da luz, *overnight*. Após este período, foi adicionado às células um mL de *wash solution* (parte integrante do kit) e estas foram aquecidas a 40°C por 10 minutos, seguidas por centrifugação a 500 x g, por cinco minutos a temperatura ambiente. Após a repetição do procedimento acima citado, as células foram ressuspensas em 500 µL de *DNA staining solution* (parte integrante do kit) contendo iodeto de propídio e RNase e incubadas a 4°C ao abrigo da luz por três horas. A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (*BD Biosciences, EUA*), analisados através do Software FlowJo

versão 10.0 de acordo com a estratégia de *gates* demonstrada na Figura 8. A determinação do comprimento relativo dos telômeros (RTL) foi realizada a partir do cálculo apresentado na Figura 7.

(Média da intensidade de fluorescência da amostra com a probe – Média da intensidade de fluorescência da amostra sem a probe) x índice do DNA das células controle x 100

(Média da intensidade de fluorescência da amostra com a probe – Média da intensidade de fluorescência da amostra sem a probe) x índice do DNA das células da amostra x 100

Exemplificando, se substituirmos os valores como abaixo, temos:

$$\text{RTL} = \frac{(670-162) \times 2 \times 100}{(5552-440) \times 1} = 19,87\%$$

Figura 8 Fórmula para o cálculo do comprimento relativo do telômero, em relação às células controle da linhagem 1301.

O RTL calculado acima indica que a média de fluorescência do telômero por cromossomo nos linfócitos TCD8+ é 19,87% da média de fluorescência do telômero por cromossomo das células controle (linhagem 1301). Como as células 1301 apresentam um telômero com comprimento de 23,48 Kbp (100), realizamos uma regra de três simples para convertamos o valor de porcentagem em Kbp.

Figura 9 Avaliação do comprimento do telômero de linfócitos TCD4+ (purificados por seleção magnética) utilizando células controle 1301. A) refere-se às células hibridizadas sem a *probe*. B) refere-se às células hibridizadas com a *probe*. Gates eletrônicos em FITC x PI delimitam os linfócitos e células 1301 em fase G₀/1 (ciclo que permite a determinação do comprimento do telômero por apresentar uma cópia única do DNA); FL₃ em escala linear representando o sinal fluorescente da marcação de DNA com iodo de propídeo; FL₁ em escala logarítmica representando o sinal fluorescente da *probe* (PNA/FITC)

4.6 Fenotipagem dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico

Para a fenotipagem, parte das PBMC's obtidas conforme item 4.2 foram marcadas como descrito no item 4.3 com um mix de anticorpos (anti-CD3 marcado com BD Horizon V500, anti-CD4 marcado com BD Horizon V450, anti-CD8 marcado com APC-Cy7, anti-CD28 marcado com APC, anti-CD45RA marcado com FITC e anti-CCR7 marcado com PE-Cy7 (*todos da BD Biosciences, EUA*). A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, em citômetro LSRFortessa™ com os dados analisados através do Software FlowJo versão 10.0, seguindo a estratégia de *gates* demonstrada na Figura 9.

Figura 10 Estratégia de *gates* para a fenotipagem dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico. Subpopulações analisadas: Memória central (MC) = CCR7+CD45RA⁻; Naive (N) = CCR7+CD45RA⁺; Memória Efetora (ME) = CCR7-CD45RA⁻; Terminalmente Diferenciadas (TEMRA) = CCR7-CD45RA⁺.

Além disso, foi realizado o controle FMO para delimitar os cortes para os marcadores CD45RA e CCR7 como mostra figura 10.

Figura 11 Exemplo de experimento FMO para otimizar a delimitação das populações CD45RA+ e CCR7+.

4.7 Dosagem de citocinas

Para a dosagem dos níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF e IL-12_{p70}) e anti-inflamatória (IL-10) utilizamos os soros dos indivíduos participantes coletados em tubo seco e separados por centrifugação de 300 x g (*Centrifuge 5810R, Eppendorf*) por 10 minutos à temperatura ambiente, e conservados a -80°C até a dosagem das citocinas, sendo descartadas após o descongelamento para a dosagem. Para as dosagens foram utilizados kits do Cytometric Bead Array (CBA) de alta sensibilidade: Human IFN- γ enhanced sensitivity flex set (Cat n°561515), Human IL-6 enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561512), Human IL-1 β enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561509), Human IL-10 enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561514), Human TNF enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561516), Human IL-8 enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561513), Human IL-12_{p70} enhanced sensitivity flex set (Cat n° 561518, todos da *BD Biosciences*), seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Resumidamente, as amostras de soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com as microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas. Logo após, as amostras foram incubadas com anticorpos de detecção marcados com ficoeritrina (PE). A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa e os resultados foram gerados utilizando o *software* BD FCFAPArray 3.0 (*BD Biosciences*).

4.8 Programa de reabilitação pulmonar

O programa de exercícios realizado rotineiramente no Ambulatório de Reabilitação do serviço de Fisioterapia do Hospital das Clínicas é denominado Reabilitação Pulmonar, e abrange o atendimento de pacientes com doenças respiratórias crônicas, dentre elas a mais comum é a DPOC.

O programa é orientado por duas fisioterapeutas responsáveis, e possui duração de 3 meses, com frequência de duas vezes por semana. Além disso, o paciente é instruído a realizar caminhada e exercícios em casa nos dias em que não os realizava no hospital, de acordo com diário de exercícios entregue, explicado e acompanhado durante todo o programa.

O programa é composto de 24 sessões de 1 hora divididas em 30 minutos de exercício aeróbio e 30 minutos de treino muscular. Além disso, possui duas sessões que consistem na avaliação do paciente, onde o indivíduo realiza a adaptação nos equipamentos, testes de força máximo para cálculo da carga dos exercícios de treino muscular e teste de caminhada de seis minutos. O exercício aeróbio é realizado em 50 a 70% da Frequência Cardíaca, determinado pela estimativa de intensidade de treino de Karvonen ($FC_t = FC_{rep} + [(FC_{máx} - FC_{rep}) * \text{intensidade de treino em \%}]$), sendo a $FC_{máx} = 220 - \text{idade}$ (140). Os sintomas de dispneia e desconforto foram medidos através da escala de BORG modificada (141). A frequência cardíaca, e a saturação periférica (SpO2) foram monitorados a cada 5 minutos. Foi providenciada oxigenação suplementar quando necessário para manter a SpO2 acima de 90%.

O treino muscular era composto de exercícios para os grandes grupos musculares dos membros superiores e inferiores, iniciando com três séries de oito repetições de cada exercício com carga de 50% de 1RM (142). Subsequentemente, as repetições aumentavam progressivamente para três séries de doze repetições. Quando mais de doze repetições conseguiam ser realizadas, a carga do treino era aumentada em 10% da carga (143). Os pacientes também receberam uma parte educacional individual composta dos temas: fisiopatologia da DPOC e tratamento, autocuidado, fisiologia do exercício, e importância da atividade física. Para análise dos resultados obtidos, os pacientes precisavam completar pelo menos 80% (20 sessões) do programa.

4.9 Padronização do antígeno *Haemophilus influenzae*

Para a padronização do ensaio de linfoproliferação com o uso do estímulo de *Haemophilus influenzae* foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a magnitude da resposta linfoproliferativa.

Para isso as células foram colocadas em placas de 96 alvéolos, em estado basal (sem estímulo), e na presença de um lisado de suspensão de *H. influenza* em quatro

diferentes concentrações: 20µg/mL, 25µg/mL, 30µg/mL e 35µg/mL, em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂ por períodos de três dias.

Porém, o comportamento dos indivíduos controles não nos permitiu verificar uma curva dose resposta, já que as respostas dos indivíduos foram variáveis nas concentrações testadas, exibindo diferentes respostas ao antígeno (Figura 11). Deste modo, não foi possível limitar os ensaios à uma única concentração.

Figura 12 Análise dos resultados de quatro indivíduos controles quanto a proliferação de linfócitos, para padronização das concentrações de uso do antígeno *H. influenzae*.

Portanto, utilizamos as concentrações de 20µg/mL, 25µg/mL e 30µg/mL, pois estas se demonstraram as mais responsivas e com melhor viabilidade celular. A partir das três concentrações realizamos a média de proliferação entre as três concentrações.

4.10 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o *software GraphPad Prisma 5.0* (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para cada variável avaliada no estudo procedeu-se a análise do conjunto de resultados pelo teste KS para determinar se a distribuição dos mesmos era paramétrica ou não paramétrica.

Para a comparação dos portadores de DPOC pré e pós-programa de reabilitação, foi utilizado o *Paired t test* para os dados paramétricos e o *Wilcoxon signed rank test* para os dados não paramétricos, sendo utilizados mediana e *interquartile range* pra representações gráficas.

Para a comparação entre os grupos de portadores de DPOC e tabagistas sem DPOC, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos e o *Unpaired t test* na comparação dos dados paramétricos, utilizando a mediana com *interquartile range* para as representações gráficas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando apresentaram o $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 DPOC e Tabagistas sem DPOC

5.1.1 Dados clínicos e demográficos

Dos 23 pacientes com DPOC incluídos no estudo, foram avaliados 17 pacientes com DPOC, já que devido a problemas técnicos/metodológicos 6 pacientes foram excluídos da amostra, e 17 tabagistas sem diagnóstico de doença pulmonar. As características clínico-demográficas dos indivíduos participantes estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Caracterização e parâmetros bioquímicos avaliados nos portadores de DPOC e tabagistas sem DPOC.

	DPOC (n = 17)	Tabagistas (n=17)	p
Idade	65.4 (60-77)	65.18 (61-75)	0.91
Índice de Massa Corpórea (kg/m²)	24.79 (15.2-31.04)	25.21 (19.38-32.40)	0.87
Função Pulmonar Ratio (VEF₁/CVF)	54.19 (42-68)	93.88 (83-103)	<u>≤ 0.0001</u>
Função Pulmonar (VEF₁)	43 (25-68)	85.82 (64-119)	<u>≤ 0.0001</u>
Carga Tabágica (maços x ano)	57 (0-114)	52.74 (23.5-125)	0.68
Proteína C reativa (mg/L)	5.98 (1.8-10.9)	3.4 (0.3-10.8)	<u>0.0149</u>
CAT(pontuação)	20.71 (13-30)	7.11 (0-17)	<u>≤ 0.0001</u>
mMRC (pontuação)	1.7 (1-3)	0.05 (0-1)	<u>≤ 0.0001</u>
Leucócitos (mil/mm³)	8.01 (5.93-11.46)	8.31 (4.01-12.34)	0.66
Linfócitos (mil/mm³)	1.89 (0.82-2.94)	2.35 (1.44-3.62)	<u>0.052</u>
Hemoglobina (g/dL)	14.14 (11-17.9)	14.2 (11.6-16.8)	0.90
Hematócrito (%)	42.2 (32.2-50.1)	41.7 (34.8-50)	0.52

Dados apresentados em Média (mínimo - máximo).

É possível verificar que idade, IMC, e carga tabágica são equiparáveis nos dois grupos, e a prova de função pulmonar identifica que os tabagistas não exibem alterações pulmonares sugestivas do diagnóstico de DPOC. Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados, verificamos que indivíduos DPOC possuem maiores de proteína C reativa do que tabagistas sem DPOC ($p=0.0149$), uma importante proteína de fase aguda (marcador de resposta inflamatória). Além disso, verificamos que os indivíduos com DPOC possuem uma tendência a menor número de linfócitos ($p=0.052$).

5.1.2 Comprimento relativo do telômero

A análise do comprimento relativo do telômero foi realizada nas subpopulações de linfócitos T totais (CD3) e subpopulações de TCD4+ e TCD8+ como demonstrado na Figura 12.

Figura 13 Comprimento relativo do telômero em linfócitos T totais (CD3), linfócitos T auxiliares (CD4) e linfócitos T citotóxicos (CD8) em kilopares de base.

É possível verificar que o comprimento relativo do telômero em pacientes com DPOC é menor do que em paciente tabagistas sem DPOC, sendo mais expressivo nos linfócitos TCD8+ ($p=0.0008$), mas também estatisticamente diferente nos linfócitos TCD3 ($p=0.01$). Nos linfócitos TCD4+ há uma tendência a menores telômeros nos portadores de DPOC, porém não alcançando diferença estatística ($p=0.07$).

5.1.3 Fenotipagem de linfócitos

Outro aspecto avaliado foi a composição de linfócitos TCD4+ e TCD8+ quanto a subpopulação de células *naive* (CD45RA+CCR7+); memória central (CCR7+CD45A-); memória efetora (CCR7-CD45RA-); e terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) (CCCR7-CD45RA+).

Como podemos ver na figura 13 não há diferenças significativas nos linfócitos TCD4+ para nenhuma das subpopulações estudadas. Porém, nos linfócitos TCD8+ podemos verificar maiores porcentagens de células T_{EMRA} nos portadores de DPOC ($p=0.007$), menores porcentagens de células de memória central ($p=0.09$) e memória efetora ($p=0.011$).

A **B**

Figura 14 A) Subpopulações de células em linfócitos T auxiliares (CD4). B) Subpopulações de células em linfócitos T citotóxicos (CD8).

À respeito da quantidade de células senescentes foi possível verificar conforme figura 14 que na subpopulação de linfócitos T CD4, não há diferença entre os pacientes portadores de DPOC e tabagistas sem DPOC. Mas, quando analisada a população de linfócitos TCD8+, verificamos que os portadores de DPOC apresentam maior número de células senescentes (CD28-) comparados com os tabagistas ($p=0.02$), enquanto as células CD28+ se encontram diminuídas ($p=0.02$).

Figura 15 Porcentagem de células senescentes (CD28-) nas subpopulações de linfócitos TCD4+ (A) e linfócitos TCD8+ (B).

5.1.4 Dosagem de citocinas no soro

Para a dosagem de citocinas no soro dos indivíduos em ambos os grupos foram escolhidas 7 citocinas, principalmente com perfil pró-inflamatório: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF e IFN- γ e uma anti-inflamatória, IL-10. Podemos verificar que os pacientes com DPOC apresentam maiores quantidades de citocinas comparados aos tabagistas sem DPOC, alcançando diferença estatística para algumas citocinas pró-inflamatórias e para a citocina anti-inflamatória IL-10, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 Quantificação de citocinas por *Cytometric bead array* de alta sensibilidade no soro de pacientes com DPOC e tabagistas.

Citocinas	DPOC (n=17)	Tabagistas (n=17)	P
IL-1 β	1599 (0-11714)	412,7 (0-4788)	<u>0.04</u>
IL-6	1876 (110.5 – 5809)	979,8 (0-698)	<u>0.0017</u>
IL-8	9306 (3155-29314)	11650 (2388-54646)	0.46
IL-10	1415 (0-15666)	93,71 (0-1059)	<u>0.0003</u>
IL-12p70	1873 (0-25990)	7,45 (0-74.28)	<u>0.03</u>
TNF	1411 (0-11049)	476,7 (0-5444)	0.41
IFN- γ	0 (0-0)	0 (0-0)	-

Dados em média e interquartile (fg/mL); Limites de detecção (fg/mL): IL-10: 13.7; IFN- γ : 66.7; IL-8: 69.9; IL-1 β : 48.4; IL-12p70: 12.6; IL-6: 68.4; TNF: 67.3.

5.2 DPOC Pré e Pós Programa de Reabilitação

5.2.1 Dados demográficos dos pacientes com DPOC

Foram incluídos no estudo 23 pacientes portadores de DPOC encaminhados para o programa de reabilitação do Hospital das Clínicas da FMUSP, porém somente 15 indivíduos completaram as 24 sessões do programa e foram avaliados nos dois momentos pelo estudo. Além disso, um dos concluintes do programa sofreu um episódio de exacerbação 15 dias antes da coleta, e por isso, também foi excluído desta análise.

A caracterização dos 14 pacientes avaliados no estudo se encontra na Tabela 3. A média de idade do grupo foi de 65.5 anos, com IMC médio de 23.85kg/m², e carga tabágica de 52.29 maços x ano.

Tabela 3 Caracterização dos pacientes com DPOC incluídos e concluintes do programa de exercícios.

DPOC	
(n=14)	
Idade (Mínimo - Máximo)	65.5 (60-76)
Índice de massa corpórea (IMC) (kg/m ²)	23.85 (15.2 – 28.44)
Carga Tabágica (maços x ano)	52.29 (0-94)
Sexo (M/F)	7/7
Função pulmonar ratio (VEF ₁ /CVF)	55 (42-68)
Função pulmonar (VEF ₁)	42.36 (25-68)

Dados apresentados em Média (mínimo - máximo).

5.2.2 Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com DPOC

Os dados clínicos e laboratoriais do grupo de pacientes com DPOC nos dois períodos (pré e pós-programa de reabilitação) são apresentados na Tabela 4. Dos parâmetros analisados, o número de leucócitos apresentou significância estatística ($p=0.02$), comparando os dois momentos de coleta, demonstrando menores valores após a reabilitação. Os resultados dos questionários e do teste de caminhada, utilizados para avaliar a condição dos pacientes antes e depois do programa de exercícios foram significativamente diferentes, com valores menores nos questionários, demonstrando menos queixas de sintomas e estado geral, e valores maiores no teste de caminhada, demonstrando uma maior tolerância ao exercício.

Tabela 4 Dados clínicos e laboratoriais do grupo de pacientes com DPOC que concluíram o programa de reabilitação.

	DPOC Pré-reabilitação (n=14)	DPOC Pós-reabilitação (n= 14)	<i>p</i>
Proteína C Reativa (mg/L)	6.22 (2.3 – 12)	14.19 (0.5-112.5)	0.82
Leucócitos (mil/mm³)	8.63 (5.93 – 11.46)	7.75 (5.43 – 9.98)	<u>0.02</u>
Linfócitos (mil/mm³)	2 (1.08 – 2.94)	1.86 (0.82 – 3.45)	0.2
Hematócrito (%)	41.21 (34.9 – 50.1)	41.25 (34.2 – 49.8)	0.93
Hemoglobina (g/dL)	13.82 (11.4 – 17.9)	13.71 (11 – 17.2)	0.59
CAT (pontuação)	21.8 (13 – 34)	16.67 (4 – 28)	<u>0.0009</u>
mMRC (pontuação)	2.85 (2-4)	2.21 (1-3)	<u>0.03</u>
TC6 (metros)	395 (216 – 689)	445.5 (348 – 758)	<u>0.001</u>

Dados apresentados em média (mínimo - máximo)

5.2.3 Cultura de células para avaliação da linfoproliferação

Na análise da linfoproliferação detectada pelo aumento da porcentagem de expressão de Ki67, verificamos que sem estímulo exógeno (“basal”), as células demonstraram uma proliferação semelhante entre o período pré e pós-reabilitação para as subpopulações de linfócitos T (CD3+), linfócitos T auxiliares (CD4+) e linfócito T citotóxicos (CD8) como mostra a Figura 15.

Figura 16 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição sem estímulo nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8).

Quando utilizado PHA verificamos o aumento da resposta linfoproliferativa no período pós-reabilitação (Figura 16), sendo significativamente diferente para as subpopulações de linfócitos T totais CD3+ ($p = 0.03$) e T auxiliares CD4+ ($p = 0.02$). Apesar de um pouco maior pós-reabilitação, a resposta proliferativa na população TCD8+ não sofreu efeito significativo do exercício.

Figura 17 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com mitógeno PHA nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.

Para as células estimuladas com lisado viral de CMV foi possível verificar aumento significativo em todos os pacientes, perceptível na população de linfócitos T CD3+ ($p=0.0005$) e linfócitos T CD4+ ($p=0.0012$), e em menor nível em linfócitos T CD8+ ($p=0.0005$), no período após o programa de reabilitação, evidenciando uma melhor resposta proliferativa das células (Figura 17).

Figura 18 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com CMV nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.

Nas células estimuladas com *H. Influenzae* foi possível verificar melhora da resposta proliferativa na população de linfócitos TCD3+ ($p=0.0058$) e TCD4+ ($p=0.0034$) (Figura 18). Porém, a resposta proliferativa da subpopulação de TCD8+ se mostrou menor, sugerindo que nestes pacientes antígenos de *H. influenzae* ativam preferencialmente linfócitos TCD4+.

Figura 19 Porcentagem de células positivas para Ki67 na condição estimulada com HAE nas três subpopulações de linfócitos: T totais (CD3), T auxiliares (CD4) e T citotóxicos (CD8). Valores das porcentagens de expressão de Ki67 sem estímulo foram subtraídos.

5.2.4 Cultura de células para avaliação da apoptose

Verificamos que na ausência de estímulo não há diferença entre as moléculas anti-apoptóticas (Bcl-2), e moléculas pró-apoptóticas (Caspase-3) antes e depois do programa de exercício para nenhuma população de linfócitos. Da mesma forma quando estimuladas com PHA também não foi possível verificar mudança significativa na expressão das moléculas de apoptose para as subpopulações de linfócitos (Figura 19).

Figura 20 Expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Caspase-3, sem estímulo exógeno (A), e estimulada com PHA (B) nos períodos antes e depois do programa de exercícios, para as três populações de linfócitos.

5.2.5 Avaliação da quantidade de citocinas no soro de pacientes pré e pós programa de reabilitação

Para a dosagem de citocinas no soro dos indivíduos em ambos os grupos foi realizada a técnica de *Cytometric bead array* de alta sensibilidade, que permite quantificar em fg/ml as citocinas na amostra. Foram escolhidas 7 citocinas, principalmente de perfil pró-inflamatório com exceção da IL-10: IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70, TNF e IFN- γ . Dentre as citocinas avaliadas nota-se que a citocina predominante é a IL-8, tanto no período pré-reabilitação como no período pós-reabilitação (Tabela 5). A única citocina que exibiu diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$) foi IL-10.

Tabela 5 Dosagens séricas de citocinas no soro pré e pós-programa de reabilitação pulmonar.

Citocinas	Pré-reabilitação	Pós-reabilitação	<i>p</i>
	(n=14)	(n=14)	
IL-1β	1875 (0-11714)	2602 (0-23694)	1
IL-6	1412 (125,8-4064)	2459 (0-9609)	0.12
IL-8	7846 (4398-14158)	21035 (1473-95890)	0.95
IL-10	667,9 (0-2257)	1187 (0-12597)	<u>0.03</u>
IL-12p70	405 (0-2207)	1080 (0-12430)	0.81
TNF	1706 (0-11049)	3081 (0-19700)	0.91
IFN -γ	0 (0-0)	0 (0-0)	-

Dados em média e *interquartile range* (fg/mL); Limites de detecção (fg/mL): IL-10: 13.7; IFN- γ : 66.7; IL-8: 69.9; IL-1 β : 48.4; IL-12p70: 12.6; IL-6: 68.4; TNF: 67.3.

6. Discussão

Em nosso estudo quando comparamos pacientes com DPOC e tabagistas ativos, encontramos maiores níveis de proteína C reativa e menores quantidades de linfócitos nos pacientes com DPOC. Nossos dados corroboram os dados de Pinto-Plata et al.(144) e Torres et al. (145) que também encontraram níveis altos de proteína C reativa em indivíduos DPOC estáveis quando comparados com tabagistas sem DPOC. Por outro lado, Torres et al. (145) comparando DPOC fumantes e DPOC ex-fumantes não verificou diferença nos níveis deste marcador, sugerindo que este aumento não estaria relacionado diretamente com o tabagismo. A proteína C reativa é um marcador de avaliação do *status* inflamatório, proposto como um simples e útil marcador de vulnerabilidade, principalmente em populações idosas (146). De acordo com Musunuru et al. (147), altos níveis de proteína C reativa estão associados a menor desempenho físico, limitação funcional e incapacidade em pessoas idosas. Da mesma maneira Torres et al. (145) verificaram que em teste de caminhada de 6 minutos há uma correlação negativa entre os níveis de proteína C reativa e a distância percorrida em pacientes com DPOC. Resultados similares foram apresentados por Pinto-Plata et al. (144). A inflamação medida pela elevação da PCR pode então indicar que estes pacientes com DPOC possuem um maior *status* inflamatório, maior vulnerabilidade e descondicionalismo físico, o que pode ser visto na diminuída capacidade funcional no período pré-reabilitação dos pacientes incluídos em nosso trabalho.

O aumento de linfócitos nos indivíduos tabagistas sem DPOC também já foi descrito na literatura por Costabel et al. (148) ao realizarem caracterização das subpopulações de linfócitos entre grupo de tabagistas e não tabagistas. No estudo de Bijl et al. (149) o número absoluto de linfócitos se encontra aumentado em fumantes quando comparados a não fumantes, e a explicação deste aumento é sugerida pela estimulação constante destes linfócitos nos tabagistas (150). Estes autores descreveram aumento de células CD3+ em tabagistas comparados a indivíduos não fumantes sugerindo a participação destas células na resposta inflamatória. Outros trabalhos descrevem aumento de linfócitos, principalmente TCD8+ nos indivíduos com DPOC, porém não há diferença quando comparados pacientes com DPOC tabagistas com DPOC não tabagistas (151, 152), o que sugere que o número de linfócitos totais não tenha relação com a DPOC, já que na doença somente os linfócitos de subpopulações específicas estão alterados.

Telômeros são complexos de proteína do DNA que revestem o final dos cromossomos com intuito de manter a estabilidade durante o processo de divisão celular. São repetições não codificantes de TTAGGG que protegem o cromossomo contra degradação, fusão ou recombinação atípica (153). Quando há divisão celular, os telômeros não são totalmente replicados devido à limitação da DNA polimerase em completar a replicação dos finais de moléculas lineares, o que leva ao encurtamento destas estruturas (154). Nas células somáticas o tamanho do telômero é dinâmico, e a cada divisão celular cerca de 20 a 200 pares de bases são perdidos (155).

Em nossos resultados verificamos o encurtamento do telômero de linfócitos TCD3 e TCD8+ em pacientes com DPOC quando comparados com tabagistas sem a doença, corroborando dados de Rode et al. (156) que encontraram uma associação moderada entre encurtamento do telômero e declínio da função pulmonar; provavelmente esta associação apenas moderada foi devida a uma sub-representação dos casos mais graves. Em nosso estudo houve pareamento entre as idades do grupo tabagista e DPOC, corroborando outro dado importante do trabalho de Rode et al. que mostra a importância de um ajuste por idade quando são associados DPOC e encurtamento do telômero. Savale et al. (88) também encontraram menor comprimento de telômero em leucócitos de paciente DPOC comparados com controles (fumantes e não fumantes). Nosso estudo amplia os resultados de Sadr et al. (157), que descreveram também menor comprimento do telômero de leucócitos de pacientes com DPOC, quando comparados a controles (fumantes e não fumantes), porém, não verificaram diferença quando os controles foram separados em fumantes e não fumantes.

Ao contrário de nosso estudo, Morlá et al.(158) conseguiram estabelecer uma curva dose resposta para o encurtamento do telômero e a carga tabágica dos participantes do estudo, porém não conseguiram demonstrar um efeito do cigarro no comprimento do telômero de acordo com a presença ou ausência de DPOC. Também diferentemente de nosso estudo, Boyer et al.(159) observaram que pacientes com DPOC possuem encurtamento do telômero, mas indivíduos fumantes também apresentaram encurtamento mesmo com espirometria normal.

A variabilidade de resultados encontrados entre os vários estudos de telômero na literatura podem se dever a diferenças metodológicas. Por exemplo, nosso estudo e o de Morlá et al(158) utilizaram a metodologia de *Flow-fish*. Outros estudos como os de (88,

156, 157, 159)) utilizaram qPCR para análise do comprimento do telômero. Este método apresenta porcentagens de erro maiores, variando entre 6,45-28% enquanto a técnica de *Flow-fish* apresenta erros de no máximo 3,3%, sendo considerada uma técnica de melhor desempenho para aferir comprimento do telômero (160). Além do aspecto metodológico, nosso estudo é, até onde vai nosso conhecimento, o primeiro a avaliar o comprimento do telômero nas diferentes subpopulações de linfócitos, aspecto relevante pois cada subpopulação tem funções e participações diferenciadas na resposta imune. Na DPOC os linfócitos pulmonares estão frequentemente ativados (70) e são capazes de secretar mediadores implicados na patogênese da doença (63). Os linfócitos T transitam entre o foco inflamatório e órgãos e linfonodos, sendo que parte destas células extravasa para a circulação linfática e sanguínea (161). A maioria dos estudos indica que os linfócitos TCD8+ possuem um importante papel no desenvolvimento e progressão da doença (33, 61, 81), e, deste modo, parecem ser os mais envolvidos na resposta, passando por diversos ciclos replicativos, e, portanto com maior encurtamento do telômero. Porém, linfócitos CD4+ são os principais responsáveis pela orquestração do processo imunológico através da secreção de citocinas com capacidade de amplificar a resposta inflamatória e estimular outras células do sistema imune, além de auxiliar na promoção da sobrevivência das células TCD8+ e na diferenciação de linfócitos B(162). Portanto, os linfócitos TCD4+ apesar de possuírem importantes funções na resposta imunológica parecem estar menos ativos na DPOC o que talvez explique, em parte, o menor encurtamento do telômero comparado com os linfócitos TCD8+.

A inflamação é uma resposta fisiológica complexa a estímulos deletérios como injúria e infecção. Este processo pode ser agudo como resultado de um estímulo transitório, ou persistente no caso de um estado crônico. A inflamação crônica pode causar apoptose e necrose celular, facilitar a liberação de potentes espécies reativas de oxigênio como superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (163, 164)

Deste modo, o ambiente pro-inflamatório encontrado nos pacientes com DPOC, como documentado pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias encontradas no soro pode ser parcialmente responsável por este encurtamento. Nossos resultados demonstrando níveis altos de IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12p70 estão de acordo com evidências de que pacientes com DPOC comparados com controles saudáveis possuem níveis aumentados de proteína C reativa, fibrinogênio, leucócitos e TNF- α , indicando uma inflamação persistente presente nestes pacientes (165). O meio celular tem um papel

importante na regulação do tamanho do telômero e na atividade da telomerase. *In vitro*, o estresse oxidativo pode levar ao encurtamento do telômero, assim como antioxidantes podem desacelerar este processo (166).

IL-1 β é um mediador de resposta inflamatória produzida por fagócitos mononucleares ativados, neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais. Esta citocina requer dois sinais, o primeiro que ativa a transcrição gênica, e um segundo que ativa o inflamassomo que irá clivar o precursor e gerar a citocina madura (167). É um potente ativador de macrófagos alveolares em pacientes com DPOC, e está correlacionada com a gravidade da doença (168, 169). Samei et al. (169) encontraram níveis aumentados de IL-1 β em pacientes moderados, graves e muito graves. Sapey et al. (170) demonstraram que há níveis aumentados desta citocina não somente em pacientes com DPOC estáveis, mas também durante exacerbações. Além disso, há uma correlação significativa com o FEV₁, sugerindo um papel no aspecto clínico da gravidade da doença. A produção desta citocina é induzida pelo tabagismo, e está envolvida na inflamação e produção de diversos mediadores, sendo um importante mecanismo no desenvolvimento da DPOC em indivíduos suscetíveis (171).

IL-6 é uma citocina importante nas respostas inflamatórias apresentando efeitos locais e sistêmicos, induz a síntese hepática de mediadores inflamatórios e a diferenciação de linfócitos TCD4⁺ produtores de IL-17, além de estimular a produção de neutrófilos pela medula óssea (167). Esta citocina é produzida por fagócitos mononucleares, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos em resposta a diversos estímulos como alérgenos, vírus respiratórios, e exercício (172). Grubek-Jaworska et al. (173) e Eickmeier et al. (174) encontraram aumento dos níveis de IL-6 no escarro de pacientes com DPOC, apresentando forte correlação inversa com a porcentagem de VEF₁. Estudo longitudinal de 3 anos sobre marcadores inflamatórios de pacientes com DPOC verificou aumento de IL-6 sérica, sendo este marcador, juntamente com outros marcadores (PCR, IL-8, fibrinogênio, CCL18, DP-D) capazes de prever variáveis de piora clínica (175). Também foi descrito associação de altos níveis de IL-6 com a piora clínica nos pacientes com DPOC (176). Estudo avaliando a exposição de epitélio pulmonar à fumaça de cigarro mostrou indução da produção de IL-6 pelas células epiteliais expostas (177). Deste modo a literatura sugere o importante papel da IL-6 como moduladora da função pulmonar na patogênese da DPOC.

IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória, com papel central nos processos infecciosos, limitando a resposta imune a patógenos e consequentemente prevenindo dano ao hospedeiro. Diversas células da imunidade inata e adaptativa produzem esta citocina, e diferentes estímulos modulam o nível de IL-10 produzida em uma célula. A indução da produção de IL-10 em algumas situações pode estar atrelada à produção de citocinas pró-inflamatórias, como um mecanismo regulador, pois as vias de produção podem regular negativamente a expressão de moléculas pró-inflamatórias (178). Na literatura há dados descrevendo menores níveis de IL-10 no escarro de pacientes com DPOC comparados com controles fumantes e não fumantes, porém o mesmo trabalho vai de acordo com nossos dados descrevendo níveis aumentados de IL-10 no sangue destes mesmos pacientes em comparação com os mesmos grupos controles (179). Entretanto, Zhang et al. (180) encontraram níveis semelhantes de IL-10 entre pacientes com DPOC e fumantes, havendo diminuição desta citocina somente quando os DPOC foram comparados a indivíduos não tabagistas. Em nosso estudo, diferentemente, verificamos menores níveis desta citocina nos indivíduos tabagistas sem DPOC. Feng et al. (181) descreveram que em escarro induzido há menores níveis de IL-10 em pacientes com DPOC em exacerbação, concordando com os dados de Maneechotesuwan et al. (182) que descreveram esta mesma diminuição porém em pacientes com DPOC estáveis. No trabalho de Pinto-plata et al. (183) os autores descreveram um perfil de biomarcadores por *microarray*, cuja a expressão foi capaz de distinguir pacientes com DPOC e pacientes tabagistas ou não tabagistas sem DPOC, demonstrando níveis mais altos de TNF- α , IL-10, IL-8, IL-1 β e IL-17 nos pacientes com DPOC. O aumento de IL-10 nos pacientes com DPOC possivelmente reflete mecanismo regulador da inflamação exacerbada presente nos pulmões destes pacientes.

IL-12p70 é produzida por fagócitos apresentadores de antígenos em resposta à infecções microbianas e malignidade via estimulação da imunidade inata e adaptativa (184). É uma citocina indutora primordialmente de linfócitos Th1 associados à resposta inflamatória protetora contra infecções intracelulares e câncer (185). Gessner et al. (186) descreveram altos níveis de IL-12p70, IL-10, IL-8, IL-6 e TNF- α no ar exalado condensado de pacientes com DPOC comparados com tabagistas, e controles não tabagistas, assim como em nossos resultados no soro destes pacientes. Nos pacientes com DPOC há um impacto combinado de leucócitos ativados, células endoteliais e epiteliais que geram mediadores levando a um influxo de células inflamatórias, que promove

remodelamento e dano tecidual, esta citocina pode estar aumentada devido a destruição do parênquima pulmonar, que aumenta a susceptibilidade a infecções, sendo necessário um influxo de células Th1 para a defesa contra microrganismos.

Ao realizar a fenotipagem das subpopulações de linfócitos verificamos que não houve diferença entre as porcentagens de células *naive*, memória central, memória efetora e células T_{EMRA} para TCD4+. Entretanto, na subpopulação de células TCD8+ verificamos maior porcentagem de células T_{EMRA} nos pacientes com DPOC e maiores porcentagens de células de memória efetora, e memória central nos tabagistas.

São muitos os estudos que analisam as diferentes subpopulações de linfócitos, porém uma grande diversidade de marcadores e amostras biológicas (sangue, lavado bronquioalveolar, escarro, etc) foram utilizados para esta avaliação. Diferentemente de nosso estudo, Urbanowicz et al. (187) encontraram na população de linfócitos TC8+ maiores quantidades de células terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) em indivíduos saudáveis comparados com pacientes com DPOC; além disso verificaram uma tendência a maiores quantidades de células de memória e menores quantidades de células *naive* nos pacientes com DPOC. Estes resultados discordantes podem ser explicados pela utilização de diferentes marcadores de superfície para definição das subpopulações. Em nosso estudo não utilizamos a molécula de superfície CD62L, importante na migração celular para órgãos linfoides secundários e na ativação celular, mas utilizamos o marcador CCR7, também responsável por esta migração e expresso constitutivamente por células *naive* e memória central. Nossos resultados corroboram os de Freeman et al. (67) que também encontraram aumento de células T_{EMRA} CD45RA+CCR7- em biópsias pulmonares de pacientes com DPOC. Nossos dados também corroboram os de Mustimbo et al. (188) que encontraram menores níveis de células de memória central e memória efetora em pacientes com DPOC quando comparados com tabagistas. É interessante ressaltar que os marcadores utilizados para a delimitação das populações nestes dois trabalhos foram os mesmos utilizados em nosso trabalho. Já Paats et al. (189) utilizaram apenas o marcador CD45RO e CD45RA para verificar células de memória e *naive*, assim como em nosso estudo, não encontraram diferenças na subpopulação de linfócitos TCD4+ entre pacientes com DPOC e indivíduos saudáveis, mas diferentemente de nossos resultados, também não encontraram alterações no compartimento de linfócitos TCD8+. No estudo de Bree et al. (190) não foram encontradas diferenças entre as populações no sangue periférico, porém no pulmão foi possível verificar menores quantidades de células de memória

central, e maiores quantidades de células de memória efetora demonstrando uma compartimentalização das subpopulações de linfócitos. Schaberg et al. (150) e Tanigawa et al. (191) verificaram que tanto as células *naive* (CD45RA+) como as células de memória (CD45RO+) estavam aumentadas nos tabagistas quando comparados com não tabagistas. Deste modo podemos verificar, como já estabelecido na literatura, que a utilização de um único marcador (RA/RO) não é suficiente para determinar o fenótipo (*naive* ou memória) de uma célula. Coletivamente, estes trabalhos sugerem a hipótese de uma diminuída resposta celular sistêmica nos pacientes com DPOC, com células fenotipicamente exauridas e com capacidade funcional comprometida, que pode levar a uma menor qualidade/eficiência da resposta imune a patógenos, aumentando o risco de infecções respiratórias e, conseqüentemente, de episódios de exacerbações.

As células de memória central e memória efetora possuem alta responsividade à estimulação antigênica, porém o potencial de expansão diminui das células de memória central para células de memória efetora, sendo as de mais baixa resposta as células terminalmente diferenciadas que re-expressam CD45RA(T_{EMRA}). Essa proliferação diminuída está correlacionada com a diminuição do comprimento do telômero e com o aumento da propensão à apoptose (192). Deste modo, moléculas co-estimulatórias poderiam auxiliar na superação desta limitação intrínseca das células induzindo à maior atividade da telomerase e a maior expressão de moléculas pró-apoptóticas, que contribuiriam para a eliminação destas células exauridas e pouco funcionais do sangue (193, 194). Quando há estímulo antigênico persistente, a cada ciclo de ativação há uma irreversível e progressiva diminuição da expressão de CD28, o que leva a um acúmulo de células T exauridas com tamanhos de telômero críticos (195). Nossos achados corroboram dados da literatura que descrevem que as células CD8+CD28- e CD4+CD28- estão aumentadas em pacientes com DPOC, e sua expansão está comumente associada à exposição a inalantes nocivos que induzem injúria epitelial e levam à desregulação da resposta imunológica (28). Ekberg-Jansson et al. (196) avaliaram lavado bronquioalveolar e também encontraram menores números de células CD8+ CD28+ em tabagistas comparados com não fumantes. Altas quantidades de células CD8+CD28- foram encontradas em pacientes com DPOC quando comparados a indivíduos saudáveis no trabalho de Hodge et al. (82), assim como no trabalho de Gadgil et al. (97). Porém discordando de nosso trabalho Reyes et al. (197) encontrou quantidades semelhantes de CD28 entre pacientes com DPOC, tabagistas e não tabagistas.

Deste modo podemos verificar que os pacientes com DPOC possuem um microambiente com características pró-inflamatórias, maior proporção de células exauridas, e com capacidades funcionais diminuídas (ex: resposta linfoproliferativa), comprometendo o desenvolvimento de uma resposta imunológica competente e aumentando o risco de episódios de exacerbação. Uma observação interessante foi a de que tabagistas que não desenvolveram DPOC aparentemente não têm os mesmos efeitos imunológicos desencadeados pelo cigarro, e conseguem manter suas células fenotipicamente íntegras. Entretanto, neste estudo não foi avaliada a funcionalidade das células nestes tabagistas livres de DPOC.

Quanto o efeito do exercício nos pacientes com DPOC, como esperado, na comparação entre o período pré e pós-reabilitação verificamos menores quantidades de leucócitos, menores pontuações nos questionários de sintomas, e maiores distâncias percorridas no teste de caminhada de 6 minutos após conclusão do programa de reabilitação.

O paciente com DPOC é caracterizado como sendo um indivíduo debilitado, comumente com sintomas de depressão e ansiedade. A progressão da DPOC leva a limitações funcionais que dificultam o indivíduo a completar suas atividades de vida diária, entrando em um ciclo vicioso de inatividade e descondicionamento físico, com dispneia em atividades leves e deterioração do status de saúde (198). Os efeitos pós-exercício na distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos, e nos questionários de sintomas corroboram com a literatura de acordo com Güell et al. (199) e Torres et al. (200), que também verificaram melhora nestes resultados durante e após o programa completo. A melhora no questionário CAT e no teste de caminhada de 6 minutos após o programa de exercícios, também foi verificada por Carvalho, Brunetto e Paulin (201).

Após exercício prolongado ou repetições de exercício há diminuição do número e funcionalidade dos leucócitos. Esta diminuição pode ser explicada em parte pelo aumento dos hormônios de estresse durante o exercício (202). Além disso, durante o exercício há aumento da produção de espécies reativas de oxigênio que podem prejudicar a função de algumas células do sistema imune (203). No estudo de Van Helvoort et al. a leucocitose em resposta ao exercício nos pacientes com DPOC e nos indivíduos saudáveis parece seguir os mesmos padrões, porém esta resposta inflamatória foi ainda mais acentuada nos pacientes com DPOC (128). Mercken et al. mostraram que um programa de reabilitação pulmonar está associado a diminuição do estresse oxidativo induzido pelo exercício,

acompanhado por uma significativa melhora da capacidade de exercício nos pacientes com DPOC (204).

Nossos resultados de avaliação da linfoproliferação, para as células estimuladas com mitógeno (PHA) e antígenos (CMV e HAE) mostraram uma significativa melhora na resposta linfoproliferativa dos pacientes no período pós-reabilitação, assim como maiores níveis da citocina imunoreguladora IL-10.

Sabe-se que o sistema imunológico pode ser influenciado agudamente, e em menor grau cronicamente, pelo exercício, sendo que o exercício leve ou moderado aumenta a vigilância imunológica e a proteção do trato respiratório superior (205). De fato, nossos resultados também sugerem esta possibilidade, ao mostrar uma influência positiva do exercício na imunidade, com melhora da resposta proliferativa de linfócitos.

Não foram encontrados estudos na literatura que investiguem parâmetros funcionais do sistema imune após um programa de reabilitação pulmonar, exceto aqueles que envolvem dosagens de citocinas séricas, sendo que nestes são principalmente descritos os efeitos agudos do exercício após intervenções curtas (menores que 2 meses). Os estudos de Abe et al. e de Stankiewicz et al. (19, 206) demonstraram alta proliferação com o estímulo de PHA em pacientes com DPOC da mesma forma que em nossos pacientes na avaliação pré-reabilitação, porém em contradição com os achados de Reyes et al. que verificaram resposta proliferativa baixa com estímulos inespecíficos (PHA e anti-CD3) em pacientes com DPOC comparados com controles saudáveis não fumantes e ex-fumantes (197). A baixa resposta proliferativa para *H. Influenza* encontrada em nosso trabalho também foi vista por Abe et al., que descrevem diminuição da resposta proliferativa para um antígeno específico (P6) de *H. influenzae* em portadores de DPOC (19). Outros autores encontraram aumento da resposta proliferativa após exercício, porém apenas indivíduos adultos saudáveis foram estudados (207) (208). Entretanto mesmo neste aspecto a literatura é controversa pois outros autores encontraram diminuição da resposta proliferativa pós-exercício agudo de intensidade moderada e alta em indivíduos saudáveis (209, 210).

A explicação para essa heterogeneidade de resultados pode estar relacionada a mudança na proporção de subpopulações celulares do sangue após o exercício, ocorrendo um maior influxo de células NK, não respondedoras para PHA, o que pode contribuir para a diminuição da resposta proliferativa. Além disso, diversas técnicas estão disponíveis para o estudo da proliferação, sendo cada uma delas diferente quanto a

sensibilidade/especificidade para cada tipo celular, e condições de manutenção das células (211, 212). Além disso, os trabalhos envolvendo exercício e DPOC avaliam quase exclusivamente parâmetros de melhora da capacidade física e/ou parâmetros espirométricos, enquanto nosso trabalho parece ser pioneiro ao relacionar aspectos funcionais de imunidade celular como proliferação de linfócitos e secreção de citocinas em sobrenadantes de cultura antes e após programa de reabilitação pulmonar.

O encurtamento dos telômeros proporciona um bom marcador de capacidade de replicação, já que há uma relação estreita entre comprimento do telômero e capacidade de replicação, podendo indicar a saída do ciclo celular por atingir um número crítico de repetições teloméricas (213). Células com maior comprimento de telômero possuem melhor capacidade replicativa após estimulação *in vitro* (214), o que pode explicar as baixas taxas proliferativas nos pacientes com DPOC, já que nossos pacientes com DPOC apresentaram linfócitos circulantes com comprimentos de telômero mais curtos e maior proporção de linfócitos com características fenotípicas de exaustão e baixa resposta proliferativa. Para confirmar esta hipótese, as mesmas avaliações deverão ser realizadas em indivíduos saudáveis, para permitir a comparação entre adultos saudáveis não fumantes, adultos fumantes sem DPOC, e adultos fumantes que desenvolveram DPOC.

O envelhecimento saudável e a DPOC apresentam características comuns como diminuição da função pulmonar, hiperinsuflação e dilatação do espaço aéreo. Além disso, as duas situações estão relacionadas com desregulação imunológica, com aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na circulação de idosos saudáveis e DPOC e nos pulmões de indivíduos DPOC, e aumento de neutrófilos e macrófagos, principalmente nos pulmões e vias aéreas. Deste modo a DPOC pode ser considerada um fenótipo de senescência acelerada, com o aparecimento de persistente ativação da imunidade inata, e resposta pró-inflamatória (28). Os resultados apresentados aqui não somente são consistentes como expandem este conceito.

O perfil de citocinas do paciente DPOC encontrado em nosso trabalho revela quantidades aumentadas de citocinas pró-inflamatórias. Na literatura alguns trabalhos descrevem diminuição de IL-6, IL-8 e IL-4 após teste de caminhada de 6 minutos, ou após teste de esforço incremental (215, 216); nenhum estudo entretanto analisa estes parâmetros após um programa de reabilitação regular e programado. Mesmo assim, a literatura é controversa pois outros autores descrevem aumento de IL-6 e do estresse

oxidativo após teste de caminhada de 6 minutos e teste de esforço máximo (217). Em relação à IL-10, Davidson et al. (215) encontraram tendência à diminuição dos níveis de IL-10 após exercício agudo. Já Otag et al. (218) avaliaram sedentários e praticantes de atividade física e não verificaram alterações nos níveis de IL-10 nos indivíduos sedentários, porém ocorreu uma significativa diminuição deste níveis nos praticantes de atividade física. Verificou-se que o exercício físico é responsável por elevar a expressão de IL-6 no músculo ativo e este por sua vez induziria elevação dos níveis sistêmicos de IL-10 (219). Essa informação sugere um possível mecanismo para nossa observação de aumento dos níveis de IL-10 após o programa de reabilitação. Nossa interpretação é que este aumento seria benéfico ao paciente com DPOC devido ao potencial imunoregulador desta citocina, o que favoreceria uma melhor resposta proliferativa a antígenos.

7 Limitações do estudo

O estudo realizado teve algumas limitações. Os marcadores utilizados para a realização da fenotipagem dos linfócitos poderiam ter sido melhorados com adição de marcadores como CD27, CD62L e CD45RO. Durante o andamento do projeto vimos a necessidade da inclusão de um grupo controle adicional, constituído de idoso saudáveis não fumantes para a comparação do comprimento do telômero e fenotipagem, e que já está em andamento. Além disso, na marcação para avaliação da proliferação celular poderíamos ter utilizado marcadores como CD25 e CD38, para verificar se as células que exibiram proliferação celular estavam adequadamente ativadas pós reabilitação ou se havia um declínio destas moléculas demonstrando uma resposta imune prejudicada no período pré-reabilitação. Finalmente, quanto a comparação pré e pós reabilitação poderíamos ter avaliado o nível de atividade física dos participantes via utilização de equipamentos como pedômetro ou questionário validados como IPAQ para garantir que estes indivíduos eram regularmente inativos antes da reabilitação pulmonar.

8 Conclusões

Os dados deste estudo sugerem que pacientes com DPOC comparados com tabagistas sem DPOC apresentam uma maior proporção de células com perfil de exaustão, provavelmente relacionada microambiente pró-inflamatório encontrado nestes indivíduos. Estas células apresentam menor capacidade funcional, como exemplificado pelas baixas respostas proliferativas antígenos-específicas, sugerindo um possível mecanismo associado ao maior número de infecções e risco de episódios de exacerbação nestes pacientes. Podemos sugerir também que a principal subpopulação sujeita a estas alterações é a subpopulação de células TCD8⁺ no pulmão, fundamentais na imunopatogenia da lesão pulmonar nos pacientes com DPOC. Entre as alterações encontradas nesta subpopulação estão:

- menor comprimento relativo do telômero;
- maior porcentagem de células TEMRA;
- menor porcentagem de células de Memória;

Além disso, os maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias encontradas no soro dos pacientes com DPOC (que tabagistas sem DPOC) sugerem um estado pró-inflamatório exacerbado nestes pacientes.

Finalmente, o programa de reabilitação foi capaz de melhorar alguns parâmetros da resposta imunológica, como a resposta de linfócitos a diferentes estímulos, incluindo antígeno de NTI *H. influenzae*, umas das principais bactérias causadoras de infecções respiratórias em pacientes com DPOC. Os mecanismos que explicam esta modificação podem estar relacionadas à melhora do ambiente pró-inflamatório, sugerido pelo aumento da IL-10, ou por outros mecanismos não estudados aqui, como diminuição do estresse oxidativo, melhora da atividade citotóxica de células TCD8⁺ ou células NK.

8. Referências Bibliográficas

1. Jiménez-Ruiz CA, Riesco Miranda JA, Altet Gómez N, Lorza Blasco JJ, Signes-Costa Miñana J, Solano Reina S, et al. Treatment of smoking in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Arch Bronconeumol.* 2013;49(8):354-63.
2. Shaykhiev R, Crystal RG. Innate immunity and chronic obstructive pulmonary disease: a mini-review. *Gerontology.* 2013;59(6):481-9.
3. Tudor RM. Aging and cigarette smoke: fueling the fire. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(5):490-1.
4. Torres BS. *Pneumologia*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. 37 - 50 p.
5. OMS. O papel da atividade física no Envelhecimento saudável. Florianópolis 2006.
6. Kurmi OP, Li L, Wang J, Millwood IY, Chen J, Collins R, et al. COPD and its association with smoking in the Mainland China: a cross-sectional analysis of 0.5 million men and women from ten diverse areas. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:655-65.
7. Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging(a). *Rev Port Pneumol.* 2009;15(4):743-6.
8. Cukier A, Godoy I, Pereira MC, Fernandes PMP. *Pneumologia: Atualização e Reciclagem*. 8a. ed: Elsevier; 2010.
9. Amsellem V, Gary-Bobo G, Marcos E, Maitre B, Chaar V, Validire P, et al. Telomere dysfunction causes sustained inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(12):1358-66.
10. Batliwalla FM, Damle RN, Metz C, Chiorazzi N, Gregersen PK. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsillar B cells. *J Immunol Methods.* 2001;247(1-2):103-9.
11. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1055-81.
12. Organization WH. *Tobacco*. 2015.
13. Rufino R, Silva JRLe. Bases celulares e bioquímicas da doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Bras Pneumol [Internet]*. 2006; 3(32):[241-8 pp.].
14. Hillas G, Perlikos F, Tsiligianni I, Tzanakis N. Managing comorbidities in COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2015;10:95-109.
15. Russel REK, Ford PA, Barnes PJ. *DPOC: Um guia completo para os cuidados do paciente*. Londres: CMG - Current Medicine Group; 2009.
16. Greulich T, Koczulla R, Vogelmeier C, Bals R. [Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as a systemic disease]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2009;134(23):1231-5.
17. GOLD. *Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention*. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2016.
18. Dourado VZ, Tanni SE, Vale SA, Faganello MM, Sanchez FF, Godoy I. Systemic manifestations in chronic obstructive pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2006;32(2):161-71.
19. Abe Y, Murphy TF, Sethi S, Faden HS, Dmochowski J, Harabuchi Y, et al. Lymphocyte proliferative response to P6 of *Haemophilus influenzae* is associated with relative protection from exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(7):967-71.

20. Toledo AC, Magalhaes RM, Hizume DC, Vieira RP, Biselli PJ, Moriya HT, et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. *Eur Respir J*. 2012;39(2):254-64.
21. Jardim JR, Oliveira JAd, Nascimento O. Segundo Concenso Brasileiro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). *Jornal Brasileiro de Pneumologia* [Internet]. 2004; 30:[1-24 pp.].
22. Menezes AM, Perez-Padilla R, Jardim JR, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005;366(9500):1875-81.
23. Campos HS. Mortalidade por DPOC no Brasil - 1980-1998. *Pulmão RJ* [Internet]. 2003; 12(4).
24. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.
25. Agustí A, Sobradillo P, Celli B. Addressing the complexity of chronic obstructive pulmonary disease: from phenotypes and biomarkers to scale-free networks, systems biology, and P4 medicine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(9):1129-37.
26. Chung KF, Adcock IM. Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1334-56.
27. Cosio MG, Sietta M, Agustí A. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2009;360(23):2445-54.
28. Sharma G, Hanania NA, Shim YM. The aging immune system and its relationship to the development of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2009;6(7):573-80.
29. Bush A. COPD: a pediatric disease. *COPD*. 2008;5(1):53-67.
30. Teramoto S. [Recent progress in genetic background of chronic obstructive pulmonary disease (COPD)]. *Nihon Rinsho*. 2016;74(5):733-42.
31. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and immune response in COPD: where do we stand? *Mediators Inflamm*. 2013;2013:413735.
32. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):16-27.
33. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 2004;350(26):2645-53.
34. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378(9795):1015-26.
35. Gao W, Li L, Wang Y, Zhang S, Adcock IM, Barnes PJ, et al. Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirology*. 2015;20(5):722-9.
36. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3546-56.
37. Aaron SD, Angel JB, Lunau M, Wright K, Fex C, Le Saux N, et al. Granulocyte inflammatory markers and airway infection during acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):349-55.
38. Rennard SI, Fogarty C, Kelsen S, Long W, Ramsdell J, Allison J, et al. The safety and efficacy of infliximab in moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(9):926-34.
39. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, et al. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from

patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(1):24-31.

40. Bhowmik A, Seemungal TA, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. 2000;55(2):114-20.

41. de Boer WI, Hau CM, van Schadewijk A, Stolk J, van Krieken JH, Hiemstra PS. Expression of epidermal growth factors and their receptors in the bronchial epithelium of subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(2):184-92.

42. Russell RE, Thorley A, Culpitt SV, Dodd S, Donnelly LE, Demattos C, et al. Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(4):L867-73.

43. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD*. 2004;1(1):59-70.

44. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax*. 2002;57(7):590-5.

45. Berenson CS, Garlipp MA, Grove LJ, Maloney J, Sethi S. Impaired phagocytosis of nontypeable *Haemophilus influenzae* by human alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis*. 2006;194(10):1375-84.

46. Silva MT. Macrophage phagocytosis of neutrophils at inflammatory/infectious foci: a cooperative mechanism in the control of infection and infectious inflammation. *J Leukoc Biol*. 2011;89(5):675-83.

47. Di Stefano A, Maestrelli P, Roggeri A, Turato G, Calabro S, Potena A, et al. Upregulation of adhesion molecules in the bronchial mucosa of subjects with chronic obstructive bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;149(3 Pt 1):803-10.

48. Sapey E, Stockley JA, Greenwood H, Ahmad A, Bayley D, Lord JM, et al. Behavioral and structural differences in migrating peripheral neutrophils from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(9):1176-86.

49. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:451-64.

50. Bateman ED, Reddel HK, van Zyl-Smit RN, Agusti A. The asthma-COPD overlap syndrome: towards a revised taxonomy of chronic airways diseases? *Lancet Respir Med*. 2015;3(9):719-28.

51. Barnes PJ. Asthma-COPD Overlap. *Chest*. 2016;149(1):7-8.

52. Eltboli O, Mistry V, Barker B, Brightling CE. Relationship between blood and bronchial submucosal eosinophilia and reticular basement membrane thickening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2015;20(4):667-70.

53. Pascoe S, Locantore N, Dransfield MT, Barnes NC, Pavord ID. Blood eosinophil counts, exacerbations, and response to the addition of inhaled fluticasone furoate to vilanterol in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a secondary analysis of data from two parallel randomised controlled trials. *Lancet Respir Med*. 2015;3(6):435-42.

54. Pavord ID, Lettis S, Locantore N, Pascoe S, Jones PW, Wedzicha JA, et al. Blood eosinophils and inhaled corticosteroid/long-acting β -2 agonist efficacy in COPD. *Thorax*. 2016;71(2):118-25.

55. Zhu J, Qiu YS, Majumdar S, Gamble E, Matin D, Turato G, et al. Exacerbations of Bronchitis: bronchial eosinophilia and gene expression for interleukin-4, interleukin-5, and eosinophil chemoattractants. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(1):109-16.

56. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(7):512-21.
57. Robbins CS, Bauer CM, Vujicic N, Gaschler GJ, Lichty BD, Brown EG, et al. Cigarette smoke impacts immune inflammatory responses to influenza in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(12):1342-51.
58. Lugade AA, Bogner PN, Murphy TF, Thanavala Y. The role of TLR2 and bacterial lipoprotein in enhancing airway inflammation and immunity. *Front Immunol*. 2011;2:10.
59. Bandi V, Apicella MA, Mason E, Murphy TF, Siddiqi A, Atmar RL, et al. Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(11):2114-9.
60. Shimizu K, Yoshii Y, Morozumi M, Chiba N, Ubukata K, Uruga H, et al. Pathogens in COPD exacerbations identified by comprehensive real-time PCR plus older methods. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:2009-16.
61. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK. Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(3):852-7.
62. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, et al. CD8+ve cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):711-7.
63. Grumelli S, Corry DB, Song LZ, Song L, Green L, Huh J, et al. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med*. 2004;1(1):e8.
64. Solleiro-Villavicencio H, Quintana-Carrillo R, Falfán-Valencia R, Vargas-Rojas MI. Chronic obstructive pulmonary disease induced by exposure to biomass smoke is associated with a Th2 cytokine production profile. *Clin Immunol*. 2015;161(2):150-5.
65. Hodge G, Nairn J, Holmes M, Reynolds PN, Hodge S. Increased intracellular T helper 1 proinflammatory cytokine production in peripheral blood, bronchoalveolar lavage and intraepithelial T cells of COPD subjects. *Clin Exp Immunol*. 2007;150(1):22-9.
66. Klein J, Sato A. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000;343(10):702-9.
67. Freeman CM, Curtis JL, Chensue SW. CC chemokine receptor 5 and CXC chemokine receptor 6 expression by lung CD8+ cells correlates with chronic obstructive pulmonary disease severity. *Am J Pathol*. 2007;171(3):767-76.
68. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003;101(11):4260-6.
69. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(2):136-48.
70. Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, Mitchell JD, Cosgrove GP, Brown KK, et al. Oligoclonal CD4+ T cells in the lungs of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(5):590-6.
71. Di Stefano A, Caramori G, Capelli A, Gnemmi I, Ricciardolo FL, Oates T, et al. STAT4 activation in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2004;24(1):78-85.
72. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):316-24.

73. Pridgeon C, Bugeon L, Donnelly L, Straschil U, Tudhope SJ, Fenwick P, et al. Regulation of IL-17 in chronic inflammation in the human lung. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(12):515-24.
74. Vargas-Rojas MI, Ramírez-Venegas A, Limón-Camacho L, Ochoa L, Hernández-Zenteno R, Sansores RH. Increase of Th17 cells in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2011;105(11):1648-54.
75. Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN. Increased peripheral blood T-cell apoptosis and decreased Bcl-2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(2):160-6.
76. Gogebakan B, Bayraktar R, Ulasli M, Oztuzcu S, Tasdemir D, Bayram H. The role of bronchial epithelial cell apoptosis in the pathogenesis of COPD. *Mol Biol Rep*. 2014;41(8):5321-7.
77. Kosacka M, Porebska I, Korzeniewska A, Rubinsztajn R, Grabicki M, Jankowska R, et al. Serum levels of apoptosis-related markers (sFasL, TNF- α , p53 and bcl-2) in COPD patients. *Pneumonol Alergol Pol*. 2016;84(1):11-5.
78. Brown V, Elborn JS, Bradley J, Ennis M. Dysregulated apoptosis and NFkappaB expression in COPD subjects. *Respir Res*. 2009;10:24.
79. Kalathil SG, Lugade AA, Pradhan V, Miller A, Parameswaran GI, Sethi S, et al. T-regulatory cells and programmed death 1+ T cells contribute to effector T-cell dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(1):40-50.
80. Fattouh M, El-din AN, Alkady O. Peripheral Blood Lymphocyte Cell Subsets and Their Association with Lung Functions in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of American Science [Internet]*. 2015; 11(4):[147-56 pp.].
81. Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J*. 2001;17(5):946-53.
82. Hodge G, Mukaro V, Reynolds PN, Hodge S. Role of increased CD8/CD28(null) T cells and alternative co-stimulatory molecules in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Immunol*. 2011;166(1):94-102.
83. Shaw JG, Vaughan A, Dent AG, O'Hare PE, Goh F, Bowman RV, et al. Biomarkers of progression of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *J Thorac Dis*. 2014;6(11):1532-47.
84. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):133-41.
85. Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*. 2001;107(1):67-77.
86. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev*. 1999;13(18):2388-99.
87. Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, Ando K, et al. Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet*. 1998;102(4):397-402.
88. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(7):566-71.
89. Kirkham PA, Caramori G, Casolari P, Papi AA, Edwards M, Shamji B, et al. Oxidative stress-induced antibodies to carbonyl-modified protein correlate with severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184(7):796-802.

90. Bhat TA, Panzica L, Kalathil SG, Thanavala Y. Immune Dysfunction in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12 Suppl 2:S169-75.
91. Nunes SOV, Castro MRPd, Castro MSAd. *Tabagismo, comorbidades e danos à saúde: EDUEL*; 2010.
92. Shepard RJ, Shek PN. Impact of physical activity and sport on the immune system. *Rev Environ Health.* 1996;11(3):133-47.
93. Nieman DC. Exercise immunology: practical applications. *Int J Sports Med.* 1997;18 Suppl 1:S91-100.
94. Qiu SL, Zhong XN. [Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease and emphysema]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2010;33(4):298-300.
95. Nieman DC. Marathon training and immune function. *Sports Med.* 2007;37(4-5):412-5.
96. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL. The effects of acute and chronic exercise of immunoglobulins. *Sports Med.* 1991;11(3):183-201.
97. Gadgil A, Zhu X, Sciurba FC, Duncan SR. Altered T-cell phenotypes in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(6):487-8.
98. Chao CC, Strgar F, Tsang M, Peterson PK. Effects of swimming exercise on the pathogenesis of acute murine *Toxoplasma gondii* Me49 infection. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;62(2):220-6.
99. Lee N, Shin MS, Kang I. T-cell biology in aging, with a focus on lung disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012;67(3):254-63.
100. Derradji H, Bekaert S, Van Oostveldt P, Baatout S. Comparison of different protocols for telomere length estimation by combination of quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) and flow cytometry in human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 2005;25(2A):1039-50.
101. De Haan JB, Crack PJ, Flentjar N, Iannello RC, Hertzog PJ, Kola I. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep.* 2003;8(2):69-79.
102. Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, et al. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. *J Immunol Methods.* 2010;362(1-2):43-50.
103. Schmid I, Dagarag MD, Hausner MA, Matud JL, Just T, Effros RB, et al. Simultaneous flow cytometric analysis of two cell surface markers, telomere length, and DNA content. *Cytometry.* 2002;49(3):96-105.
104. Woods JA, Lowder TW, Keylock KT. Can exercise training improve immune function in the aged? *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959:117-27.
105. Martins MdA, Carrilho FJ, Alves VAF, Castilho EAd, Cerri GG, Wen CL. *Clínica médica, volume 1 : atuação da clínica médica, sinais e sintomas de natureza sistêmica, medicina preventiva, saúde da mulher, envelhecimento e geriatria, medicina laboratorial na prática médica.* Barueri: Manole; 2009. 571-81 p.
106. Silva LC, de Araújo AL, Fernandes JR, Matias MeS, Silva PR, Duarte AJ, et al. Moderate and intense exercise lifestyles attenuate the effects of aging on telomere length and the survival and composition of T cell subpopulations. *Age (Dordr).* 2016;38(1):24.
107. Shinkai S, Kohno H, Kimura K, Komura T, Asai H, Inai R, et al. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc.* 1995;27(11):1516-26.
108. Ogawa K, Oka J, Yamakawa J, Higuchi M. Habitual exercise did not affect the balance of type 1 and type 2 cytokines in elderly people. *Mech Ageing Dev.* 2003;124(8-9):951-6.

109. Drela N, Kozdron E, Szczypiorski P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC Geriatr.* 2004;4:8.
110. Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, Akama T, Tanabe K, Nishijima T, et al. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev.* 2008;14:24-37.
111. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas CM, Tudhope SJ, Wedzicha JA, et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J.* 2010;35(5):1039-47.
112. Oga T, Nishimura K, Tsukino M, Sato S, Hajiuro T. Analysis of the factors related to mortality in chronic obstructive pulmonary disease: role of exercise capacity and health status. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;167(4):544-9.
113. Pitta F, Troosters T, Probst VS, Spruit MA, Decramer M, Gosselink R. Quantifying physical activity in daily life with questionnaires and motion sensors in COPD. *Eur Respir J.* 2006;27(5):1040-55.
114. Pitta F, Breyer MK, Hernandez NA, Teixeira D, Sant'Anna TJ, Fontana AD, et al. Comparison of daily physical activity between COPD patients from Central Europe and South America. *Respir Med.* 2009;103(3):421-6.
115. Hernandez NA, Teixeira DeC, Probst VS, Brunetto AF, Ramos EM, Pitta F. Profile of the level of physical activity in the daily lives of patients with COPD in Brazil. *J Bras Pneumol.* 2009;35(10):949-56.
116. Spruit MA, Singh SJ, Garvey C, ZuWallack R, Nici L, Rochester C, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: key concepts and advances in pulmonary rehabilitation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(8):e13-64.
117. Sobrinho GC, James T, Pond Z, Welch L, Batchelor S, Copp R, et al. Impact of pulmonary rehabilitation on cough and sputum symptom perception in patients with COPD. *European Respiratory Journal [Internet].* 2015; 46(59).
118. Falschlehner S, Petrovic M, Czuchajda E, Ott B, Forster A, Berger A, et al. The effect of outpatient pulmonary rehabilitation on COPD assessment test (CAT) and GOLD classification – A retrospective data analysis. *European Respiratory Journal [Internet].* 2015; 46(15).
119. Jelusic D, Wittmann M, Schuler M, Schultz K. How does regular exercise affect dyspnoea (TDI) and quality of life (CAT) of COPD-patients 1 year after an inpatient pulmonary rehabilitation (PR)? *European Respiratory Journal [Internet].* 2015; 46(59).
120. Priori R, Dekker MKJ, Sillen MJH, Barretto CM, Saini PK, Klee M, et al. Physical activity, exercise capacity and psycho-social factors during and after pulmonary rehabilitation in COPD. *European Respiratory Journal [Internet].* 2015; 46(59).
121. Mador MJ, Krauza M, Shaffer M. Effect of exercise training in patients with chronic obstructive pulmonary disease compared with healthy elderly subjects. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2012;32(3):155-62.
122. Dourado VZ, Tanni SE, Antunes LC, Paiva SA, Campana AO, Renno AC, et al. Effect of three exercise programs on patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(3):263-71.
123. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. *Am Rev Respir Dis.* 1993;147(5):1151-6.
124. Heindl S, Lehnert M, Criée CP, Hasenfuss G, Andreas S. Marked sympathetic activation in patients with chronic respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;164(4):597-601.

125. Rabinovich RA, Figueras M, Ardite E, Carbó N, Troosters T, Filella X, et al. Increased tumour necrosis factor- α plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients. *Eur Respir J*. 2003;21(5):789-94.
126. Heunks LM, Viña J, van Herwaarden CL, Folgering HT, Gimeno A, Dekhuijzen PN. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*. 1999;277(6 Pt 2):R1697-704.
127. Couillard A, Maltais F, Saey D, Debigaré R, Michaud A, Koechlin C, et al. Exercise-induced quadriceps oxidative stress and peripheral muscle dysfunction in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(12):1664-9.
128. van Helvoort HA, van de Pol MH, Heijdra YF, Dekhuijzen PN. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2005;99(12):1555-67.
129. Broekhuizen R, Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Raised CRP levels mark metabolic and functional impairment in advanced COPD. *Thorax*. 2006;61(1):17-22.
130. Moy ML, Teylan M, Weston NA, Gagnon DR, Danilack VA, Garshick E. Daily step count is associated with plasma C-reactive protein and IL-6 in a US cohort with COPD. *Chest*. 2014;145(3):542-50.
131. Hurst JR, Donaldson GC, Perera WR, Wilkinson TM, Bilello JA, Hagan GW, et al. Use of plasma biomarkers at exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174(8):867-74.
132. Holz O, Roepcke S, Watz H, Tegtbur U, Lahu G, Hohlfeld JM. Constant-load exercise decreases the serum concentration of myeloperoxidase in healthy smokers and smokers with COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2015;10:1393-402.
133. Chetta A, Olivieri D. The COPD Assessment Test in the evaluation of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Expert Rev Respir Med*. 2012;6(4):373-5.
134. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA. Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*. 1999;54(7):581-6.
135. Laboratories. ATS statement: guidelines for the six-minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166(1):111-7.
136. Enright PL. The six-minute walk test. *Respir Care*. 2003;48(8):783-5.
137. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):648-55.
138. Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med*. 1999;190(2):157-67.
139. Baerlocher GM, Roth A, Lansdorp PM. Telomeres in hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:44-8.
140. Karvonen Mj, Kentala E, Mustala O. The effects of training on heart rate; a longitudinal study. *Ann Med Exp Biol Fenn*. 1957;35(3):307-15.
141. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc*. 1982;14(5):377-81.
142. Storer TW. Exercise in chronic pulmonary disease: resistance exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(7 Suppl):S680-92.
143. Kraemer WJ, Adams K, Cafarelli E, Dudley GA, Dooly C, Feigenbaum MS, et al. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2002;34(2):364-80.

144. Pinto-Plata VM, Müllerova H, Toso JF, Feudjo-Tepie M, Soriano JB, Vessey RS, et al. C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers. *Thorax*. 2006;61(1):23-8.
145. de Torres JP, Cordoba-Lanus E, López-Aguilar C, Muros de Fuentes M, Montejo de Garcini A, Aguirre-Jaime A, et al. C-reactive protein levels and clinically important predictive outcomes in stable COPD patients. *Eur Respir J*. 2006;27(5):902-7.
146. Yoshida Y, Iwasa H, Kumagai S, Yoshida H, Suzuki T. Association between C-reactive protein (CRP) level and physical performance in community-dwelling elderly in Japan. *Arch Gerontol Geriatr*. 2010;51(2):164-8.
147. Musunuru K, Kral BG, Blumenthal RS, Fuster V, Campbell CY, Gluckman TJ, et al. The use of high-sensitivity assays for C-reactive protein in clinical practice. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2008;5(10):621-35.
148. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Rühle KH, Matthys H. Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*. 1986;90(1):39-44.
149. Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Effects of smoking on activation markers, Fas expression and apoptosis of peripheral blood lymphocytes. *Eur J Clin Invest*. 2001;31(6):550-3.
150. Schaberg T, Theilacker C, Nitschke OT, Lode H. Lymphocyte subsets in peripheral blood and smoking habits. *Lung*. 1997;175(6):387-94.
151. de Jong JW, van der Belt-Gritter B, Koëter GH, Postma DS. Peripheral blood lymphocyte cell subsets in subjects with chronic obstructive pulmonary disease: association with smoking, IgE and lung function. *Respir Med*. 1997;91(2):67-76.
152. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, Tsoumakidou M, Tsiligianni I, Klimathianaki M, et al. Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest*. 2004;125(1):71-6.
153. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):611-22.
154. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17312-5.
155. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1019:278-84.
156. Rode L, Bojesen SE, Weischer M, Vestbo J, Nordestgaard BG. Short telomere length, lung function and chronic obstructive pulmonary disease in 46,396 individuals. *Thorax*. 2013;68(5):429-35.
157. Sadr M, Noori Mugahi SM, Hassanzadeh G, Nadji SA, Kiani A, Abedini A, et al. Telomere Shortening in Blood Leukocytes of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Tanaffos*. 2015;14(1):10-6.
158. Morlá M, Busquets X, Pons J, Sauleda J, MacNee W, Agustí AG. Telomere shortening in smokers with and without COPD. *Eur Respir J*. 2006;27(3):525-8.
159. Boyer L, Chouaïd C, Bastuji-Garin S, Marcos E, Margarit L, Le Corvoisier P, et al. Aging-related systemic manifestations in COPD patients and cigarette smokers. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121539.
160. Gutierrez-Rodrigues F, Santana-Lemos BA, Scheucher PS, Alves-Paiva RM, Calado RT. Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. *PLoS One*. 2014;9(11):e113747.
161. Lehmann C, Wilkening A, Leiber D, Markus A, Krug N, Pabst R, et al. Lymphocytes in the bronchoalveolar space reenter the lung tissue by means of the

alveolar epithelium, migrate to regional lymph nodes, and subsequently rejoin the systemic immune system. *Anat Rec.* 2001;264(3):229-36.

162. Gadgil A, Duncan SR. Role of T-lymphocytes and pro-inflammatory mediators in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2008;3(4):531-41.

163. Ueha S, Shand FH, Matsushima K. Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis. *Front Immunol.* 2012;3:71.

164. Choi K, Kim J, Kim GW, Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res.* 2009;6(4):213-22.

165. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax.* 2004;59(7):574-80.

166. von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(7):339-44.

167. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.

168. Singh B, Arora S, Khanna V. Association of severity of COPD with IgE and interleukin-1 beta. *Monaldi Arch Chest Dis.* 2010;73(2):86-7.

169. Sameie SAAE, Essawy TS, Elgazzar AG, Hammad DR. Evaluation of serum interleukin-1 beta as an inflammatory marker in COPD patients. *Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis [Internet]*. 2015; 64(2):[347-52 pp.].

170. Sapey E, Ahmad A, Bayley D, Newbold P, Snell N, Rugman P, et al. Imbalances between interleukin-1 and tumor necrosis factor agonists and antagonists in stable COPD. *J Clin Immunol.* 2009;29(4):508-16.

171. Thorley AJ, Tetley TD. Pulmonary epithelium, cigarette smoke, and chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2007;2(4):409-28.

172. Stadnyk AW. Cytokine production by epithelial cells. *FASEB J.* 1994;8(13):1041-7.

173. Grubek-Jaworska H, Paplińska M, Hermanowicz-Salamon J, Białek-Gosk K, Dąbrowska M, Grabczak E, et al. IL-6 and IL-13 in induced sputum of COPD and asthma patients: correlation with respiratory tests. *Respiration.* 2012;84(2):101-7.

174. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, Zissler U, Rosewich M, Baer PC, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine.* 2010;50(2):152-7.

175. Celli BR, Locantore N, Yates J, Tal-Singer R, Miller BE, Bakke P, et al. Inflammatory biomarkers improve clinical prediction of mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(10):1065-72.

176. Agustí A, Edwards LD, Rennard SI, MacNee W, Tal-Singer R, Miller BE, et al. Persistent systemic inflammation is associated with poor clinical outcomes in COPD: a novel phenotype. *PLoS One.* 2012;7(5):e37483.

177. Kode A, Yang SR, Rahman I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res.* 2006;7:132.

178. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.

179. Moermans C, Heinen V, Nguyen M, Henket M, Sele J, Manise M, et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. *Cytokine*. 2011;56(2):298-304.
180. Zhang L, Cheng Z, Liu W, Wu K. Expression of interleukin (IL)-10, IL-17A and IL-22 in serum and sputum of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *COPD*. 2013;10(4):459-65.
181. Feng E, Wan R, Yang S, Yan Z, Wang S, He W, et al. Expression levels of induced sputum IL-8 and IL-10 and drug intervention effects in patients with acute exacerbated COPD complicated with chronic cor pulmonale at high altitude. *Exp Ther Med*. 2013;6(3):747-52.
182. Maneechotesuwan K, Kasetsinsombat K, Wongkajornsilp A, Barnes PJ. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and IL-10/IL-17A ratio in patients with COPD. *Thorax*. 2013;68(4):330-7.
183. Pinto-Plata V, Toso J, Lee K, Park D, Bilello J, Mullerova H, et al. Profiling serum biomarkers in patients with COPD: associations with clinical parameters. *Thorax*. 2007;62(7):595-601.
184. Liu J, Cao S, Kim S, Chung EY, Homma Y, Guan X, et al. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr Immunol Rev*. 2005;1(2):119-37.
185. Kaliński P, Smits HH, Schuitemaker JH, Vieira PL, van Eijk M, de Jong EC, et al. IL-4 is a mediator of IL-12p70 induction by human Th2 cells: reversal of polarized Th2 phenotype by dendritic cells. *J Immunol*. 2000;165(4):1877-81.
186. Gessner C, Scheibe R, Wötzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2005;99(10):1229-40.
187. Urbanowicz RA, Lamb JR, Todd I, Corne JM, Fairclough LC. Altered effector function of peripheral cytotoxic cells in COPD. *Respir Res*. 2009;10:53.
188. Mustimbo, Roberts EP, Higgs BW, Brohawn P, Fernanda, Pilataxi, et al. *CD4+ T-Cell Profiles and Peripheral Blood Ex-Vivo Responses to T-Cell Directed Stimulation Delineate COPD Phenotypes*. Journal of the COPD foundation [Internet]. 2015; 2.
189. Paats MS, Bergen IM, Hoogsteden HC, van der Eerden MM, Hendriks RW. Systemic CD4+ and CD8+ T-cell cytokine profiles correlate with GOLD stage in stable COPD. *Eur Respir J*. 2012;40(2):330-7.
190. de Bree GJ, Daniels H, Schilfgaarde M, Jansen HM, Out TA, van Lier RA, et al. Characterization of CD4+ memory T cell responses directed against common respiratory pathogens in peripheral blood and lung. *J Infect Dis*. 2007;195(11):1718-25.
191. Tanigawa T, Araki S, Nakata A, Kitamura F, Yasumoto M, Sakurai S, et al. Increase in memory (CD4+CD29+ and CD4+CD45RO+) T and naive (CD4+CD45RA+) T-cell subpopulations in smokers. *Arch Environ Health*. 1998;53(6):378-83.
192. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:745-63.
193. Son NH, Murray S, Yanovski J, Hodes RJ, Weng N. Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol*. 2000;165(3):1191-6.
194. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995;3(1):87-98.
195. Vallejo AN. CD28 extinction in human T cells: altered functions and the program of T-cell senescence. *Immunol Rev*. 2005;205:158-69.

196. Ekberg-Jansson A, Andersson B, Avrå E, Nilsson O, Löfdahl CG. The expression of lymphocyte surface antigens in bronchial biopsies, bronchoalveolar lavage cells and blood cells in healthy smoking and never-smoking men, 60 years old. *Respir Med.* 2000;94(3):264-72.
197. Reyes E, Prieto A, de la Hera A, de Lucas P, Alvarez-Sala R, Alvarez-Sala JL, et al. Treatment with AM3 restores defective T-cell function in COPD patients. *Chest.* 2006;129(3):527-35.
198. Rous MRG. *Rehabilitación Pulmonar: Medical & Marketing Communications*; 1999.
199. Guell R, Casan P, Belda J, Sangenis M, Morante F, Guyatt GH, et al. Long-term effects of outpatient rehabilitation of COPD: A randomized trial. *Chest.* 2000;117(4):976-83.
200. de Torres JP, Pinto-Plata V, Ingenito E, Bagley P, Gray A, Berger R, et al. Power of outcome measurements to detect clinically significant changes in pulmonary rehabilitation of patients with COPD. *Chest.* 2002;121(4):1092-8.
201. Paulin E, Brunetto AF, Carvalho CRF. Efeitos de programa de exercícios físicos direcionado ao aumento da mobilidade torácica em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. *J Pneumologia [Internet]*. 2003; 29 (5).
202. Moynihan JA, Callahan TA, Kelley SP, Campbell LM. Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon-gamma production in vitro. *Cell Immunol.* 1998;184(1):58-64.
203. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev.* 1999;5:22-56.
204. Mercken EM, Hageman GJ, Schols AM, Akkermans MA, Bast A, Wouters EF. Rehabilitation decreases exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;172(8):994-1001.
205. Nieman DC, Pedersen BK. Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med.* 1999;27(2):73-80.
206. Stankiewicz W, Dabrowski MP, Chcialowski A, Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators Inflamm.* 2002;11(5):307-12.
207. Tossige-Gomes R, Ottone VO, Oliveira PN, Viana DJ, Araújo TL, Gripp FJ, et al. Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(6):492-8.
208. Henson DA, Nieman DC, Parker JC, Rainwater MK, Butterworth DE, Warren BJ, et al. Carbohydrate supplementation and the lymphocyte proliferative response to long endurance running. *Int J Sports Med.* 1998;19(8):574-80.
209. Nieman DC, Miller AR, Henson DA, Warren BJ, Gusewitch G, Johnson RL, et al. Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Int J Sports Med.* 1994;15(4):199-206.
210. Siedlik JA, Benedict SH, Landes EJ, Weir JP, Vardiman JP, Gallagher PM. Acute bouts of exercise induce a suppressive effect on lymphocyte proliferation in human subjects: A meta-analysis. *Brain Behav Immun.* 2016;56:343-51.
211. Bagchi D, Sen CK, Nair S. *Nutrition and Enhances Sports Performance: muscle binding, endurance and strength.* San Diego, California: Elsevier; 2013.
212. Gleeson M, Bishop N, Walsh N. *Exercise Immunology.* New York, New York: Routledge Taylor & Francis Group; 2013.

213. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(21):10114-8.
214. Murillo-Ortiz B, Albarrán-Tamayo F, López-Briones S, Martínez-Garza S, Benítez-Bribiesca L, Arenas-Aranda D. Increased telomere length and proliferative potential in peripheral blood mononuclear cells of adults of different ages stimulated with concanavalin A. *BMC Geriatr*. 2013;13:99.
215. Davidson WJ, Verity WS, Traves SL, Leigh R, Ford GT, Eves ND. Effect of incremental exercise on airway and systemic inflammation in patients with COPD. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(12):2049-56.
216. Dorneles GP, Vianna P, Del Duca Lima D, Galant L, Dias AS, Chies JA, et al. Cytokine response to the 6-min walk test in individuals with different degrees of COPD. *Clin Respir J*. 2016;10(3):326-32.
217. van Helvoort HA, Heijdra YF, de Boer RC, Swinkels A, Thijs HM, Dekhuijzen PN. Six-minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest*. 2007;131(2):439-45.
218. Otag A, Deveci D, Otag I, Kosar I. Effects of exercise on the interleukin-10, white blood cells and creatine kinase in sportsmen and sedentaries. *Global Journal of Medical Research Microbiology and Pathology* [Internet]. 2013; 13(3).
219. Mathur N, Pedersen BK. Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:109502.

9. Apêndices

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do exercício físico na resposta imune celular em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) com diferentes graus de gravidade

Pesquisador: Gil Benard

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34535514.4.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 780.843

Data da Relatoria: 03/09/2014

Apresentação do Projeto:

A pesquisa visa avaliar pacientes portadores de DPOC e sua resposta imunológica ao exercício físico

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a resposta imunológica entre pacientes com DPOC Gold C e D, avaliando a resposta linfoproliferativa nos dois grupos, antes e após treinamento físico, avaliar a resposta apoptótica nos 2 grupos e, comparar o comprimento do telômero celular e avaliar citocinas antes e após exercício físico

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos mínimos envolvidos em virtude da realização de exercícios físicos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não apresenta questionamentos éticos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi corrigido e adaptado ao texto do projeto. Os pesquisadores justificaram o porque da não realização de avaliação cardíaca previa aos exercícios físicos, baseado em literatura internacional.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 780.843

Recomendações:

APROVADO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO SEM PENDENCIAS

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 05 de Setembro de 2014

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

O seu nome: _____

Data de hoje: _____

Como está a sua DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica)? Faça o Teste de Avaliação da DPOC (COPD Assessment Test™ – CAT)

Este questionário irá ajudá-lo a si e ao seu profissional de saúde a medir o impacto que a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica) está a ter no seu bem estar e no seu quotidiano. As suas respostas e a pontuação do teste podem ser utilizadas por si e pelo seu profissional de saúde para ajudar a melhorar a gestão da sua DPOC e a obter o máximo benefício do tratamento.

Para cada um dos itens a seguir, assinale com um (X) o quadrado que melhor o descreve presentemente. Certifique-se **que selecciona** apenas uma resposta para cada pergunta.

Por exemplo: Estou muito feliz

0	X	1	2	3	4	5
---	----------	---	---	---	---	---

 Estou muito triste

		PONTUAÇÃO							
Nunca tenho tosse	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Estou sempre a tossir	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Não tenho nenhuma expectoração (catarro) no peito	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	O meu peito está cheio de expectoração (catarro)	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Não sinto nenhum aperto no peito	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Sinto um grande aperto no peito	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Não sinto falta de ar ao subir uma ladeira ou um lance de escadas	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Quando subo uma ladeira ou um lance de escadas sinto bastante falta de ar	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Não sinto nenhuma limitação nas minhas actividades em casa	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Sinto-me muito limitado nas minhas actividades em casa	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Sinto-me confiante para sair de casa, apesar da minha doença pulmonar	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Não me sinto nada confiante para sair de casa, por causa da minha doença pulmonar	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Durmo bem /profundamente	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Não durmo bem /profundamente devido à minha doença pulmonar	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				
Tenho muita energia	<table border="1" style="display: inline-table;"><tr><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr></table>	0	1	2	3	4	5	Não tenho nenhuma energia	<input style="width: 30px; height: 20px;" type="checkbox"/>
0	1	2	3	4	5				

PONTUAÇÃO TOTAL

--	--

O Teste de Avaliação da DPOC (COPD Assessment Test) e o logótipo CAT é uma marca comercial do grupo de empresas GlaxoSmithKline.
© 2009 GlaxoSmithKline. Todos os direitos reservados.

Grau	Descrição
0	Não há problemas de falta de ar exceto com exercício intenso
1	Falta de ar ao caminhar apressadamente no plano ou ao subir ladeira “leve”
2	Caminhada mais lenta do que de pessoas da mesma idade no plano devido a falta de ar ou necessidade de parar para respirar ao caminhar em seu próprio ritmo no plano
3	Necessidade de parar para respirar após caminhar cerca de 100 m ou após andar poucos minutos no plano
4	Muita falta de ar para sair de casa, ou falta de ar quando ao tirar ou vestir a roupa

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: Nº APTO:

ENDEREÇO CIDADE

BAIRRO: CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: Nº APTO:

ENDEREÇO: CIDADE:

BAIRRO: CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Efeito do exercício físico na resposta imune celular de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) com diferentes graus de gravidade.

PESQUISADOR : Gil Benard

CARGO/FUNÇÃO: Docente –MS3 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 48049

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de dermatologia – LIM 56

AValiação DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 ANOS.

1 – Desenho do estudo e objetivo(s):

O Laboratório de Investigação Médica nº56, e os Serviços de Pneumologia e de Fisioterapia do HCFMUSP estão desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender os efeitos do treinamento físico regular no sistema imunológico celular de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica. Serão estudados diferentes componentes da resposta imunológica.

Com estes resultados espera-se, futuramente, contribuir com novos conhecimentos sobre a resposta do sistema imune e sua possível modulação a partir da prática da atividade física.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:

Se concordar em participar desta pesquisa será proposto um treinamento aeróbio, já oferecido aos pacientes do Ambulatório de Doenças Obstrutivas do Serviço de Pneumologia pelo Serviço de Fisioterapia do HCFMUSP, com finalidade de melhorar a função pulmonar, a mecânica respiratória e a capacidade funcional do paciente. Antes e após o treinamento serão coletados 60 mL de sangue do antebraço, para realização de exames laboratoriais de cultura celular e citometria de fluxo.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados:

Caso o senhor se disponha a participar deste projeto será solicitado seu comparecimento para resposta a questionário e coleta de 60 mL de sangue (aproximadamente meio copo) distribuídos em 6 tubos contendo heparina como anticoagulante, por punção periférica da veia do antebraço para a realização de exame no qual serão feitas medidas sobre sua imunidade. Estão previstas duas coletas de sangue, uma antes do início do treinamento aeróbio e outra após o término do período de treinamento. Eventualmente uma terceira coleta pode se fazer necessária para confirmação dos resultados dos testes laboratoriais, como usualmente ocorre em laboratórios de rotina e de pesquisa.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:

Como em qualquer coleta de sangue pode haver desconforto local. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça.

5 – Benefícios para o participante:

Não é previsto benefício objetivo para os participantes a não ser conhecer seu estado de saúde o que poderá proporcionar posteriormente tomar medidas para mantê-lo ou melhorá-lo, bem como a participação em estudo que poderá trazer benefícios futuros à comunidade.

Não é previsto qualquer tipo de benefício material para os participantes além do atendimento no Hospital das Clínicas. Igualmente não é previsto qualquer tipo de indenização a qualquer título.

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:

Não se aplicam.

7 – Garantia de acesso:

No caso de qualquer dúvida na evolução do presente projeto o (a) senhor (a) poderá entrar em contato com o Pesquisador responsável, Dr. Gil Benard e/ou com a Pesquisadora executante, Juliana Ruiz Fernandes através do telefone (11) 3061-7499, no endereço R. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 3º andar.

No caso de qualquer consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição:

Estou ciente de que posso suspender o tratamento ou as coletas de sangue a qualquer momento, sem que este fato implique qualquer forma de constrangimento entre mim e meu médico, que se dispõe a continuar me tratando em quaisquer circunstâncias.

09 – Direito de confidencialidade:

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores:

Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil a mim, a equipe fará todo o possível para repassá-la o mais rápido possível.

11 – Despesas e compensações:

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa:

O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da imunossenescência de idosos". Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semianalfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____