LÉIA CRISTINA RODRIGUES DA SILVA

**Impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da
imunossenescência de idosos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Léia Cristina Rodrigues da

Impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da
imunossenescência de idosos / Léia Cristina Rodrigues da Silva. -- São Paulo,
2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Envelhecimento 2.Sistema imunológico 3.Telômero
4.Exercício 5.Idoso 6.Imunidade adaptativa 7.Imunidade celular 8.Vacinação

USP/FM/DBD-343/15

Aos meus amigos de luz

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de conhecer uma pequenina fração de sua obra grandiosa.

A minha família, fonte de amor incondicional.

Aos voluntários desta pesquisa, que se tornaram verdadeiros amigos, sem os quais nada disso seria possível.

Ao programa de pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao departamento de Patologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento por meio da bolsa de doutorado (2011/18268-4) e pelo auxílio a pesquisa (2011/08817-0) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Ao Prof. Dr. Alberto José da Silva Duarte por toda a estrutura física e técnica que encontrei no LIM56, as quais me permitiram realizar este estudo.

Ao Prof. Dr. Gil Benard pela excelente orientação e pelo convívio de mais de 10 anos, o qual apesar de muitas vezes ter sido áspero, foi extremamente engrandecedor e único.

As minhas queridas amigas Dra Adriana Ladeira de Araújo e Juliana Ruiz pela ajuda na execução dos experimentos, pelo aconchego nos momentos difíceis, pelas risadas e por todo o afeto e carinho.

Ao Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme e à Dra Manuella de Toledo e Souza pelo auxílio no recrutamento dos voluntários.

À Magali Ruivo, do Programa Saber Viver de Cotia, por sua dedicação e auxílio no recrutamento de parte dos voluntários.

À querida amiga Dra. Liã Barbara Arruda pelos vários cafés, cheios de puxões de orelha, incentivo e compreensão.

Ao meu querido amigo Dr. Rafael Martins de Oliveira pelo auxílio na revisão e pelas sugestões de melhoria desta tese.

À Celeste Romano que com um sorriso estampado no rosto nos auxiliou recebendo com muito carinho nossos voluntários.

À Noemia Orie, Rosângela Araújo, Patrícia Oliveira e Tatiane Mitiko, técnicas responsáveis pelas salas de Citometria e Cultura Celular, pela manutenção das salas e pela disponibilidade em auxiliar sempre.

A todos os pesquisadores e alunos de pós-graduação do LIM-56 pela troca de conhecimento e convivência harmoniosa.

À equipe da secretária por todo o suporte administrativo e aos demais funcionários do LIM56.

“... se eu quiser falar com Deus
tenho que me aventurar
tenho que subir aos céus
sem cordas prá segurar
tenho que dizer adeus
dar as costas, caminhar
decidido, pela estrada
que ao findar vai dar em **nada**
nada, nada, nada, nada
nada, nada, nada, nada
nada, nada, nada, nada
do que eu pensava encontrar”

Gilberto Gil

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in IndexMedicus*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

I - INTRODUÇÃO	1
1.1 Envelhecimento humano.....	1
1.2 Envelhecimento versus doença	5
1.3 Imunossenescência: o envelhecimento do sistema imunológico	7
1.3.1 Imunidade Adaptativa Celular	7
1.3.1.2 Citomegalovirus e imunossenescência.....	10
1.3.2 Imunidade adaptativa humoral.....	11
1.3.3 Imunidade Inata	12
1.3.3.1 <i>Inflamm-aging</i>	12
1.4 Imunossenescência versus atividade física	13
II – OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.1.1 Específicos	20
III - CASUÍSTICA	22
IV – MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Avaliação Clínica.....	23
4.2 Coleta e processamento das amostras.....	23
4.3 Cultura de PBMC para avaliação de linfócitos e secreção de citocinas	24

4.4 Dosagens de citocinas	27
4.4.1 Em sobrenadantes de cultura.....	27
4.4.2 No soro.....	28
4.5 Separação Celular	29
4.5.1 Purificação de linfócitos TCD4 ⁺	29
4.5.2 Obtenção de linfócitos TCD4 ⁺ de memória (CD45RO ⁺) e TCD4 ⁺ “naive” (CD45RO ^{neg}).....	30
4.5.3 Purificação de linfócitos LTCD8 ⁺	31
4.5.4 Obtenção de linfócitos T CD8 ⁺ CD28 ⁺ e T CD8 ⁺ CD28 ^{neg}	33
4.6 Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente com análise por citometria de fluxo (<i>Flow-FISH</i>)	34
4.7 Análise da expressão de marcadores de apoptose	37
4.8 Fenotipagem dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ do sangue periférico	40
4.9 Coleta de soro para quantificação de anticorpos anti- <i>Influenza</i>	41
V – ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
VI- RESULTADOS	43
6.1 Dados demográficos, antropométricos e laboratoriais.....	43
6.2 Fenotipagem dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no sangue periférico	50
6.3 Determinação do comprimento do telômero dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	54
6.4 Funcionalidade dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	58
6.5 <i>Inflamm-aging</i>	66
6.6 Produção de anticorpos anti- <i>Influenza</i>	68
VII- DISCUSSÃO	72
VIII- CONCLUSÃO	79
IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICES	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μg	microgramas
μl	microlitro
°C	Centígrados
AGA	Avaliação Geriátrica Ampla
AIDS	“Acquired Immunodeficiency Syndrome”
ALO	Aspartato aminotransferase
ALP	Alanina Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
APC	“Antigen-Presenting Cell”
APC-7	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
CBA	“Cytometric Bead Array”
CD	“Cluster of Differentiation”
CMV	Citomegalovírus
Cols.	Colaboradores
DC	“Dendritic Cell”

DM	Diabetes Mellitus
DNA	“Deoxyribonucleic Acid”
DTH	“Delayed-type Hypersensitivity”
EDTA	“Ethylenediamine Tetraacetic Acid”
FA	Fosfatase Alcalina
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HLA-DR	“Human Leukocyte Antigen-DR”
HSC	“Hematopoietic Stem Cell”
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
IPAQ	“International Physical Activity Questionnaire”
Ki67	Proteína nuclear expressa durante a mitose
Kpb	kilopares de bases
LDL	“Low Density Lipoproteins”
LPS	“Lipopolysaccharide”

MAN	“Mini Nutritional Assessment”
MEEN	Mini Exame do Estado Mental
MET	“Metabolic Equivalent”
MHC	“Major Histocompatibility Complex”
mL	Mililitros
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
Neg	Negativo
ng	Nanogramas
NK	“Natural Killer”
NSAIDs	“Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs”
NT	Não Treinado
PBMC	“Peripheral Blood Mononuclear Cell”
PCR	Proteína C Reativa
PE	“Phycoerythrin”
PE-Cy5	“Phycoerythrin- Cyanine 5”
PE-Cy7	“Phycoerythrin- Cyanine 7”
pg	Picogramas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PHA	“Phytohemagglutinin”
PMA	“Phorbol 12-Myristate 13-Acetato”
PNA	“Peptide Nucleic Acid”

PPD	“Purified Protein Derivative”
PTH	Paratormônio
PW	“Pokeweed”
RNA	“Ribonucleic Acid”
SF	Soro Fetal
SF-36	“Short Form 36 Health Survey”
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
sTNF-RI	“soluble Tumor Necrose Factor Receptor-1”
SVS	Secretária de Vigilância em Saúde
T4 livre	Tiroxina Livre
TCR	“T-cell receptor”
T _{EMRA}	“T Effector Memory cell reacquired CD45RA”
Th	“T helper”
TI	Treinado Intensamente
TM	Treinado Moderadamente
T _{MC}	T Memória Central
T _{ME}	T Memória Efetora
TNF	“Tumor Necrose Factor”
TSH	“Hormônio Tiroestimulante”
TTAGGG	Timina Timina Adenosine Guanine Guanine Guanine
VO _{2max}	Consumo máximo de oxigênio
Vs	Versus

x g

Força centrífuga máxima

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proporção das pessoas de 60 anos ou mais de idade que apresentaram as morbidades referidas, por sexo, segundo o tipo de doença – Brasil – 1998/2008.....	06
Tabela 2 - Mortalidade proporcional por grupos de causas, segundo faixa etária	06
Tabela 3 - Dados dos grupos de estudo.....	42
Tabela 4 - Dados do SF36	44
Tabela 5 - Dados laboratoriais básicos.....	45
Tabela 6 - Subpopulações de linfócitos T do sangue periférico.....	50
Tabela 7 - Dosagens séricas de citocinas no soro dos idosos por CBA.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro1 - Principais alterações anatômicas e funcionais do envelhecimento humano.....	02
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estratégia de "gates" para a análise da linfoproliferação	26
Figura 2: Purificação de linfócitos TCD4.....	29
Figura 3: Obtenção de linfócitos TCD4 ⁺ de memória (CD45RO ⁺) e de linfócitos TCD4 ⁺ <i>naive</i> (CD45RO ^{neg}).....	31
Figura 4: Purificação de linfócitos TCD8	32
Figura 5: Obtenção de linfócitos T CD8 ⁺ CD28 ⁺ e T CD8 ⁺ CD28 ^{neg}	33
Figura 6: Avaliação do comprimento do telômero de linfócitos TCD8 ⁺ (purificados por seleção magnética) utilizando células controle 1301	36
Figura 7: Estratégia de "gates" para a análise da apoptose "in vitro"	38
Figura 8: Estratégia de "gates" para a fenotipagem dos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ do sangue periférico.....	40
Figura 9: Divisão dos grupos baseados no IPAQ.....	47
Figura10: Dados do teste ergoespirométrico.....	48
Figura 11: Análise dos linfócitos T periféricos.....	51
Figura 12: A análise da distribuição das células <i>naive</i> (CCR7 ⁺ CD45RA ⁺), memória central (MC= CCR7 ⁺ CD45RA ^{neg}), memória efetora (ME= CCR7 ^{neg} CD45RA ^{neg}) e terminalmente diferenciada (TEMRA = CCR7 ^{neg} CD45RA ⁺) nos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	52

Figura 13: Distribuição das subpopulações CD28 ⁺ e CD28 ^{neg} nos linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	53
Figura 14: Determinação do comprimento do telômero nos linfócitos T totais	54
Figura 15: Determinação do comprimento do telômero nas subpopulações de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	55
Figura 16: Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ <i>naive</i> e de memória.....	55
Figura 17: Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD8 ⁺ não senescente e senescente.....	56
Figura 18: Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	56
Figura 19: Análise da capacidade linfoproliferativa frente à PHA nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ naive (RO ^{neg}) e de memória (RO ⁺).....	58
Figura 20: Análise da capacidade linfoproliferativa frente a PHA nos subtipos de linfócitos TCD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺) e senescentes (CD28 ^{neg})	59
Figura 21: Análise da capacidade linfoproliferativa frente ao CMV nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ naive (RO ^{neg}) /memória (RO ⁺) e TCD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺)/ senescentes (CD28 ^{neg}).....	60
Figura 22: Perfil de secreção de citocinas em sobrenadante de cultura em pg/ml.....	61
Figura 23: Análise da apoptose “in vitro”, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ “naive” (RO ^{neg})/memória (RO ⁺).....	62

Figura 24: Análise da apoptose “in vitro”, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺)/ senescentes (CD28 ^{neg}).....	63
Figura 25: Análise da apoptose “in vitro” , expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD4 ⁺ “naive” (RO ^{neg})/memória (RO ⁺).....	64
Figura 26: Análise da apoptose “in vitro”, expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺)/ senescentes (CD28 ^{neg}).....	65
Figura 27: Cinética dos títulos de anticorpos anti-Influenza B.....	68
Figura 28: Cinética dos títulos de anticorpos anti-H ₃ N ₂	69
Figura 29: Cinética dos títulos de anticorpos anti-H ₁ N ₁	70

Silva LCR. Impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da imunossenescência de idosos. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2015.

O aumento da expectativa de vida é um evento mundial e tem alterado a pirâmide populacional, com aumento da população idosa e redução da população jovem, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. De acordo com projeções das Nações Unidas realizadas em 2012, a população brasileira com idade superior a 65 anos atingirá a média de 50 milhões no ano de 2050. O avanço da idade acarreta mudanças na composição, função fisiológica e competência do sistema imunológico humano, as quais são definidas pelo termo imunossenescência. Essas mudanças são importantes, pois contribuem para um aumento da incidência e gravidade das doenças infecciosas, diminuição da eficácia das vacinações, e possivelmente o surgimento de autoimunidade e câncer. Diminuição da população de linfócitos T “naive” com o aumento da população de linfócitos de memória, perda da molécula coestimulatória CD28, encurtamento do telômero e a presença de um background inflamatório são as principais alterações associadas à imunossenescência. No Brasil, o aumento da população idosa e consequente aumento da procura de serviço de saúde sobrecarregará o Sistema Único de Saúde. Assim, o estudo de intervenções que visem atenuar a imunossenescência é altamente relevante. Uma possível intervenção estudada é a atividade física, porém, a maior parte dos estudos avalia o impacto imediato da atividade física, e quando avaliam o impacto de atividade física regular e prolongada, o fazem com pequeno intervalo de tempo. O objetivo deste estudo foi o de avaliar o impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da imunossenescência em homens idosos. Trinta e um idosos do sexo masculino (65-85 anos) foram divididos em dois grupos, um com histórico de treinamento moderado por 15 ($\pm$ 3) anos e outro sem histórico de treinamento, avaliados quanto à porcentagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ “naive” e de memória, perda da molécula coestimuladora CD28, comprimento do telômero, capacidade linfoproliferativa, expressão de marcadores pró e anti-apoptóticos, background inflamatório e produção de anticorpos anti-influenza. Os grupos foram equiparáveis quanto à idade, capacidade cognitiva, funcional e índice de massa corpórea. Todos os idosos apresentaram bom estado nutricional e não possuíam depressão. Os idosos moderadamente treinados apresentaram um maior gasto calórico semanal (aumento dos METs, $p < 0,0001$) e um maior consumo máximo de oxigênio (VO_{2max} , $p < 0,001$), mostrando o seu maior condicionamento físico. Os idosos moderadamente treinados apresentaram uma maior porcentagem de linfócitos T_{MC} e menor frequência de linfócitos T_{emra}, maior capacidade de resposta linfoproliferativa dos linfócitos T CD8⁺ estimulados com mitógeno, menor expressão de marcador de apoptose na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ CD28^{neg} e produção de maiores títulos de anticorpos anti-influenza séricos antes e pós-vacinação. Os dados mostraram que a prática da atividade física moderada regular como estilo de vida contribuiu para a atenuação de alguns aspectos característicos da imunossenescência.

Descritores: Envelhecimento, telômero, exercício, idoso, imunidade adaptativa, imunidade celular, vacinação

Silva LCR. Impact of regular moderate aerobic exercises in delaying immunosenescence in elderly people. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2015.

Increase of life expectancy is a global event and has changed the population pyramid, with increasing elderly population and reducing young population, both in developed and developing countries. According to the United Nations in the 2012 Revision of the World Population Prospects, the Brazilian elderly population will reach 50 million people in 2050. Aging leads to marked detrimental changes in the composition, function, and competence of the human immune system, a phenomenon termed immunosenescence. These changes are associated with increased incidence and severity of infections, poor vaccine efficacy, and possibly the developing autoimmunity and cancer. Immunosenescence is associated with decreased number of naïve T cells and increased of memory T cells, loss of CD28 costimulatory molecule, telomere shortening and Inflamm-aging. In Brazil, the increase in the elderly population and the consequent increased demand for health care will encumber the Sistema Único de Saúde. Thus, the study of interventions to attenuate the immunosenescence is highly relevant. A possible intervention that has been studied is physical activity. However, the majority of studies evaluated the acute impact of physical activity or assessed the impact of short periods of chronic physical activity. The aim of this study was to evaluate the impact of regular moderate aerobic exercises in delaying immunosenescence in elderly people. Thirty one elderly men (65-85 years) were divided in two groups, one with history of moderate regular physical activity for 15 (± 3) years and the other without history of physical activity, were evaluated for percentage of CD4⁺ and CD8⁺ naïve and memory T cells, loss of CD28 costimulatory molecule, telomere length, lymphocyte proliferation, apoptosis markers, cytokine synthesis (TH1/TH2), serum levels of inflammatory cytokines and anti-influenza antibodies production. The groups were comparable regarding age, cognitive and functional abilities and body mass index. All elderly had good nutritional status and did not have depression. The moderately trained elderly had a higher weekly caloric expenditure (increase in METs, $p < 0.0001$) and a higher maximal oxygen uptake (VO₂max, $p < 0.001$), showing its higher fitness. The moderately trained elderly had a higher percentage of T_{MC} lymphocytes and lower frequency of T_{emra} lymphocytes, higher lymphoproliferative responsiveness of CD8⁺ T lymphocytes stimulated with mitogen, lower expression of apoptosis markers in the subpopulation of T CD8⁺ CD28^{neg} cells and production of higher titres serum anti-influenza antibodies before and after immunization. The data showed that the practice of regular moderate physical activity as a lifestyle contributed to reduce of the some typical features of immunosenescence.

Keywords: Aging of immune system, telomere, physical activity, elderly, adaptative immunity, cellular adaptative immunity, vaccination

I - INTRODUÇÃO

O mundo está envelhecendo! Em países desenvolvidos o aumento da expectativa de vida tem ocorrido de forma linear, e sem mostras de desaceleração, nos últimos dois séculos (1). Essa transição demográfica deve-se a diminuição nas taxas de fertilidade e mortalidade infantil, realidade que também é vivenciada no Brasil. Este se encontra atualmente em avançado estágio de transição tanto para mortalidade quanto para fertilidade, o que permite prever de maneira confiável a distribuição etária e o tamanho da população nas próximas quatro décadas. De acordo com projeções das Nações Unidas realizadas em 2012, a população brasileira com idade superior a 65 anos atingirá a média de 50 milhões no ano de 2050 (2). Segundo os últimos dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a expectativa de vida ao nascer no Brasil em 2012 foi de 74,6 anos (71 anos para a população masculina e 78,3 anos para a feminina), cinco meses e 12 dias a mais em relação à estimada em 2011 (74,1 anos) [3].

Este aumento sem precedentes na expectativa de vida da população propiciou o interesse em compreender melhor o processo de envelhecimento.

1.1 Envelhecimento humano

Segundo Alex Confort (1979) [4] o envelhecimento é caracterizado pela incapacidade de manutenção da homeostasia em condições de sobrecarga funcional. Isto se deve a alterações anatômicas e funcionais, descritas sucintamente no Quadro 1, que ocorrem com o passar dos anos, as quais são influenciadas pelas características genéticas do indivíduo e por suas interações com o meio ambiente e seu estilo de vida.

Quadro1. Principais alterações anatômicas e funcionais do envelhecimento humano

Sistema	Alterações Anatomofuncionais
Locomotor	Perda da massa óssea → fragilidade óssea; Perda das trabéculas ósseas e endurecimento das cartilagens que recobrem as superfícies articulares → ↓ resistência; ↓ Células musculares e do tecido conjuntivo intercelular (atrofia muscular) → perda da força muscular.
Nervoso	Perda de neurônios no córtex cerebral, cerebelo e na medula espinal → comprometimento da marcha, do equilíbrio e das funções cognitivas.
Circulatório	<i>Miocárdio</i> : perda de miócitos e de tecido conjuntivo nos espaços intersticiais; <i>Válvulas</i> : acúmulo de tecido fibroso com endurecimento gradativo; <i>Excito condutor</i> : perda de células com acúmulo de tecido adiposo e fibras colágenas e elásticas → perda das reservas funcionais; <i>Aorta</i> : perda de células musculares e acúmulo de fibras colágenas e alterações moleculares das fibras elásticas (↓ elasticidade) → ↓ da luz com menor perfusão sanguínea dos órgãos.
Respiratório	Depósito de Ca^{++} nas cartilagens costais tornando-as endurecidas e atrofia dos músculos respiratórios → ↓ expansão da caixa torácica na inspiração e ↓ do poder de tosse; ↓ Capacidade de retração elástica dos pulmões → baixa oxigenação sanguínea.
Digestório	Perda de neurônios nos plexos mientérico e submucoso → ↓ produção de secreções pelas glândulas do SD e ↓ motilidade do trato gastrointestinal; Perda de dentes, atrofia dos botões gustativos e ↓ produção de saliva → perda do paladar; Fechamento não completo do esfíncter gastroesofágico → refluxo (sensação de queimação); Atrofia das glândulas estomacais com ↓ produção de muco e suco gástrico → gastrite atrófica; ↓ Volume e fluxo sanguíneo do fígado e hepatócitos com acúmulo de lipofuscina e com ↓ superfície do REL → ↓ capacidade metabólica.

Urinarío	<p>↓ Número de glomérulos renais na capsula glomerular e espessamento das paredes dos túbulos renais → perda de proteína na urina e falhas na reabsorção de glicose e Na^+;</p> <p>Perda da elasticidade da parede e enfraquecimento da musculatura vesical da bexiga urinária → ↓ capacidade de retenção urinária;</p> <p>Fraqueza do músculo esfíncter externo da urinária que associado à atrofia nos músculos do assoalho pélvico → incontinência de estresse (perda de urina ao espirrar ou tossir).</p>
Genital	<p><i>Masculino:</i></p> <p>Atrofia nas células intersticiais → ↓ produção de testosterona;</p> <p>Atrofia da próstata → ↓ produção do líquido prostático;</p> <p>Deposição de tecido fibroso na parede dos vasos do pênis e nos espaços do tecido erétil → dificuldade de ereção.</p> <p><i>Feminino:</i></p> <p>Falência dos ovários → ↓ produção de estrógenos e progesterona (menopausa);</p> <p>Atrofia uterina;</p> <p>↓ Elasticidade da vagina e ↓ secreção das glândulas vestibulares → dificuldade no ato sexual.</p>
Glândulas Endócrinas	<p>↓ Discreta na produção de hormônios pela tireoide;</p> <p>↑ produção de hormônios pelas paratireoides nas mulheres → maior retirada de Ca^{++} dos ossos;</p> <p>↓ Secreção de renina → ↓ produção de aldosterona pelo córtex da supra-renal.</p>
Pele	<p>↓ Número de fibroblastos e fibras colágenas e elásticas com ↓ espessura da pele e do subcutâneo e perda de gordura nos adipócitos da tela subcutânea → surgimento de rugas;</p> <p>Atrofia das glândulas sudoríparas e sebáceas → ressecamento cutâneo;</p> <p>Perda de melanócitos → empalidecimento cutâneo;</p> <p>↓ Número de bulbos ativos dos cabelos → calvície.</p>

↓ = diminuição; ↑ = aumento; → = ocasionando; SD = sistema digestório; REL = retículo endoplasmático liso (5).

O organismo humano é formado por sistemas, que são constituídos por órgãos, formados por tecidos que são formados por células. As alterações funcionais decorrentes do envelhecimento estão relacionadas, pelo menos em parte, ao acúmulo de células senescentes (6). A senescência celular ocorre por estresse oxidativo e/ou por encurtamento do telômero (7). O estresse oxidativo é a perda do equilíbrio entre a produção de reativos de oxigênio e a ação de antioxidantes, o que tem efeito lesivo as células, uma vez que causa danos às proteínas intracelulares e ao DNA.

Telômeros (do grego *telos*, término e *meros* parte), foram descritos em trabalhos no final dos anos 1930 pelos geneticistas norte-americanos Hermann Muller (1890-1967) e Barbara McClintock (1902-1992), e definidas pela sua função protetora dos terminais dos cromossomos, sendo capazes de impedir eventos danosos para os mesmos e considerados importantes na manutenção da integridade do genoma (8,9). Nos vertebrados, os telômeros são constituídos por uma sequência hexamérica de DNA (TTAGGG), repetidas centenas a milhares de vezes, possuindo comprimento específico para cada espécie. No homem varia de cinco a 20 Kilo pares de bases (Kpb) [10]. Estes são sintetizados no final da replicação do DNA pela enzima telomerase, uma transcriptase reversa constituída por um componente proteico e por uma molécula de RNA que contém a sequência molde complementar a mais de uma repetição telomérica, capaz de impedir o encurtamento progressivo da fita (11). O mecanismo de ação da telomerase ocorre na ligação com o telômero, permitindo que ocorra um pareamento entre os nucleotídeos do telômero e o molde contido no RNA. Em seguida, a telomerase desloca-se sobre o telômero para iniciar um novo ciclo de replicação ou desliga-se do cromossomo, finalizando sua ação (11). Em algumas células especializadas, como as germinativas, fetais, células-tronco hematopoiéticas e células basais da epiderme, a telomerase se mantém ativa, fato que culmina na manutenção do comprimento do telômero ao acrescentar repetições hexaméricas às extremidades teloméricas dos cromossomos. Contudo, o mesmo não ocorre em células somáticas humanas, visto que o gene que codifica a telomerase é inativo na maioria das células, resultando na não produção da enzima. Desta

maneira, após sucessivos ciclos de replicação celular, a redução do tamanho dos telômeros torna a proteção das extremidades cromossômicas ineficiente, caracterizando o início da senescência celular que, ao atingir um determinado ponto crítico, poderá resultar na morte celular apoptótica (9,12,13).

O declínio progressivo da função celular com o aumento da idade leva a consequente alteração da função dos órgãos, em geral com a diminuição de suas reservas funcionais, propiciando o surgimento de doenças.

1.2 Envelhecimento versus doença

Sabe-se que com o aumento da idade há o aumento da taxa de prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas, hipertensão arterial, diabetes e neoplasias. A Tabela 1 mostra os dados apresentados pelo IBGE em 2013 quanto à proporção de idosos (≥ 60 anos) de ambos os sexos que apresentavam doenças crônicas não transmissíveis. A maior proporção foi de indivíduos com hipertensão arterial (14).

Tabela 1: Proporção das pessoas de 60 anos ou mais de idade que apresentaram as morbidades referidas, por sexo, segundo o tipo de doença – Brasil – 1998/2008.

Tipo de doença	Proporção das pessoas de 60 anos ou mais de idade que apresentaram as morbidades referidas, por sexo (%)					
	1998		2003		2008	
	Homem	Mulher	Homem	Mulher	Homem	Mulher
Coluna	42	48,1	32	39,8	30,5	38,7
Artrite/Reumatismo	30	43,6	20,1	33	16,3	30,4
Câncer	1,4	0,9	2,2	2,0	3,2	2,0
Diabetes	8,0	12,1	10,7	14,8	14,1	17,6
Bronquite/Asma	7,8	7,7	6,1	6,9	5,5	6,2
Hipertensão	36,6	49,7	40,4	55,3	46,3	58,7
Cardiovascular	16,6	21	15,8	18,7	16,6	17,9
Renal Crônica	7,0	6,7	4,8	3,7	3,4	3,2
Depressão	8,0	15,3	5,9	12,8	5,6	12
Tendinite	3,6	5,4	3,4	1,8	3,0	6,6
Cirrose	0,5	0,2	0,5	0,1	0,6	0,2

Nota: Dados de IBGE/PNAD 1998, 2003, 2008.

No Brasil, segundo dados do DataSUS referentes ao ano de 2010, as doenças crônicas foram responsáveis por mais de 60% das causas de óbito entre os idosos (Tabela 2) [15].

Tabela 2: Mortalidade proporcional por grupos de causas, segundo faixa etária

Grupo de causas	Mortalidade por faixa etária (%)		
	60 - 69 anos	70 - 79 anos	≥ 80 anos
Doenças infecciosas e parasitárias	3,92	3,25	3,07
Doenças neoplásicas	24,6	20,04	12,48
Doenças do aparelho circulatório	36,38	39,21	40,32
Doenças do aparelho respiratório	9,88	13,6	18,45
Causas externas	4,98	3,25	3,07
Outras Causas	20,24	20,64	22,61

Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM).

1.3 Imunossenescência: o envelhecimento do sistema imunológico

A garantia da longevidade e do envelhecimento saudável, dentre outros fatores, dá-se pela manutenção da imunidade íntegra. Entretanto, esta não é regra, pois com o avanço da idade, profundas mudanças deletérias acontecem na composição, função fisiológica e competência do sistema imunológico humano. As alterações que ocorrem com o avanço da idade e comprometem a competência do sistema imune são definidas pelo termo imunossenescência (16,17).

A etiologia da imunossenescência é multifatorial e reflete a exposição a agentes patogênicos externos e infecções virais persistentes ao longo da vida do indivíduo, as quais contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade precoce. Destacam-se as infecções do trato gastrointestinal, aumento da susceptibilidade em desenvolver autoimunidade e câncer, bem como a diminuição da capacidade de resposta às imunizações (18,19). Estes fatores contribuem para a exaustão imunológica, principalmente no compartimento de células T da imunidade adaptativa, entretanto, também afetam em menor proporção a funcionalidade das células B e o sistema imune inato (16,17).

1.3.1 Imunidade Adaptativa Celular

Uma das grandes mudanças no sistema imunológico durante o envelhecimento é o declínio no número de linfócitos T “naive”, com o aumento de linfócitos T com fenótipo de memória. O declínio no número de linfócitos T “naive” ocorre essencialmente por duas razões: com o aumento da idade, a função das células tronco hematopoiéticas (HSCs) diminui, devido a deficiências na reparação do DNA (19) e o encurtamento dos telômeros (21), ocasionando uma diminuição da capacidade de gerar progenitores linfoides. Sugere-se que com o aumento da idade ocorram mudanças no nicho de

células-tronco, por exemplo, o declínio da quantidade total de tecido hematopoiético, podendo contribuir para o declínio da função das HSCs em idosos (22).

Em segundo lugar, o timo sofre involução. Ao nascer, o timo está totalmente desenvolvido, mas logo depois do nascimento, ocorre a substituição de tecido funcional por tecido adiposo. Este processo continua ao longo da vida, e está quase completo por volta dos 50 anos (23-25). Assim, em pessoas jovens, os linfócitos T “naive” são gerados continuamente conservando o “pool” de linfócitos T “naive” mantendo a capacidade do sistema imune adaptativo de responder a uma variedade de diferentes agentes patogênicos.

Como um resultado da involução tímica, o número de linfócitos T “naive” é drasticamente reduzido (até 80%), o que leva a uma redução da capacidade do hospedeiro para responder a novos antígenos. Foi descrito uma diminuição no número de células T “naive” tanto na periferia como o tecido linfoide (26,27).

Estudos demonstraram que os linfócitos T “naive” de indivíduos idosos apresentam alterações funcionais como encurtamento do telômero, restrição no repertório dos receptores (TCRs), diminuição da produção da interleucina-2 (IL-2), diferenciação e expansão em células efetoras comprometidas quando comparadas com linfócitos “naive” de indivíduos jovens (28,29). Além destas alterações, também há diminuição da capacidade de resposta proliferativa aos antígenos, mudanças na expressão de moléculas de superfície e alterações na sinalização intracelular (30-33).

Alterações fenotípicas ocorrem também no compartimento de linfócitos T de memória, tais como a perda da expressão de CD28, um membro da família fator de necrose tumoral (TNF) que interage com CD80 e/ ou CD86 na superfície das células apresentadoras de antígeno (APCs). CD28 é uma importante molécula co-estimuladora que fornece o segundo sinal essencial para a iniciação de uma resposta imune. O acúmulo de linfócitos T, em particular os CD8⁺, que perdem a expressão de CD28 durante o envelhecimento, correlaciona-se com vários desfechos clínicos, incluindo a diminuição do controle sobre a infecção. A capacidade de produzir citocinas

pró-inflamatórias, principalmente a IL-2, também se encontra limitada nas células T CD28^{neg}, e devido aos sucessivos ciclos replicativos a que foram submetidas ao longo da vida, estas células apresentam diminuição do comprimento dos telômeros (34-36).

Em estudo realizado por Monteiro e cols (1996)^[34], foram comparados os comprimentos dos telômeros de células T CD8⁺CD28^{neg} e células T CD8⁺CD28⁺ em indivíduos normais, para avaliar o histórico replicativo. Os resultados apresentaram comprimento do telômero significativamente menor na subpopulação T CD8⁺CD28^{neg}, fato que condiz com os ciclos de replicação sofrida por estas células, presumivelmente em resposta à exposição antigênica, caracterizando a possível entrada no estado de senescência replicativa. Segundo os autores, estes dados são análogos aos do estudo de células T CD4⁺, desenvolvido por Weng e cols (1995)^[35], em que células T CD4⁺ de memória foram encontradas apresentando menor comprimento do telômero do que células T CD4⁺ “naive”.

Culturas de linfócitos T CD8⁺ senescentes (CD28^{neg}) evidenciam diversas alterações no padrão de secreção de citocinas, principalmente aumento significativo de Tumor Necrose Factor- α (TNF- α) e IL-6 e diminuição da produção de Interferon- γ (IFN- γ) e IL-2, mostrando que CD28 é essencial para estabilização de diversas citocinas (36). Além disto, análise “ex vivo” de linfócitos TCD8⁺CD28^{neg} mostrou que estes apresentaram aumento na expressão de caspase-3 quando comparados aos linfócitos TCD8⁺CD28⁺ dos mesmos indivíduos, caracterizando maior susceptibilidade a apoptose nos linfócitos senescentes (37). Apoptose ou morte celular programada é regulada por uma família de proteases intracelulares cisteínicas chamadas caspases. As caspases iniciadoras (incluindo a caspase-2, -8, -9, -10, -11, e -12) estão estreitamente ligadas aos sinais pró-apoptóticos. Uma vez ativadas, as caspases de iniciação clivam e ativam as caspases efetoras (incluindo a caspase-3, -6 e -7), que por sua vez executam a apoptose através da clivagem de proteínas nucleares. A proteólise é um processo irreversível, assim, a expressão da forma ativa da caspase-3 indica que a célula entrará em apoptose (38). Estas alterações no padrão de citocinas liberadas, associadas à

incapacidade destas células de responder apropriadamente estímulos parecem ser um evento central para a diminuição da capacidade imunológica dos idosos (38,39).

Em um estudo longitudinal sueco com indivíduos idosos (40), 86-92 anos de idade, identificou um perfil de risco imune (IRP) preditivo de aumento da mortalidade em dois anos. O IRP foi associado com a infecção latente por citomegalovírus (CMV) caracterizado pela inversão da relação de CD4/CD8 e relacionado com a expansão de linfócitos T terminalmente diferenciados (T_{emra}). Em outro estudo longitudinal também sueco (41), foram analisados indivíduos idosos mais jovens, com 66 anos, com o objetivo de examinar a relevância dos resultados já demonstrados em idosos muito velhos. A análise imunológica que foi realizada incluiu as subpopulações de células T e sorologia para CMV (imunoglobulina classe G [IgG] e imunoglobulina classe M [IgM]). O resultado mostrou uma prevalência de 15% de indivíduos com uma relação CD4/CD8 invertida, que foi associada à soro positividade para citomegalovírus e aumento no nível de linfócitos T_{emra} . A proporção de indivíduos com uma razão CD4/CD8 invertido foi significativamente mais elevada nos homens ao passo que os números de células T $CD3^+CD4^+$ foram significativamente superiores nas mulheres. Em conclusão, estes resultados foram muito semelhantes aos encontrados anteriormente, sugerindo que um perfil imunológico anteriormente identificado em indivíduos octa e nonagerianos também existe nos hexagerianos.

1.3.1.2 Citomegalovirus e imunossenescência

Os dados apresentados pelos estudos acima citados mostra que a infecção latente por CMV também parece ser um fator que contribui para o comprometimento do sistema imune durante a imunossenescência. Isto porque a infecção latente por CMV ocasiona a formação de um repertório altamente antígeno-específico de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$, o que diminui o número de linfócitos T disponíveis para responder a novos estímulos antigênicos. Em

indivíduos idosos o comprometimento pode atingir até 50% do repertório de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) [42-44].

No Brasil, estudos de soroprevalência para CMV na população entre 15 e 45 anos de idade revelaram 81% de positividade na cidade do Rio de Janeiro (45), 87,9% em Salvador (46) e de aproximadamente 90% na cidade de São Paulo (47) e Santa Catarina (48).

1.3.2 Imunidade adaptativa humoral

As alterações que ocorrem com envelhecimento no compartimento de linfócitos B são semelhantes as observadas no compartimento de linfócitos T, ou seja, diminuição das células “naive” com aumento das células de memória (17). Também foi descrito em idosos alteração no repertório de linfócitos B, com aumento da oligoclonalidade e redução na frequência de hipermutação somática (49). A dependência da interação com o linfócito TCD4⁺ que o linfócito B apresenta para executar algumas de suas funções pode também estar afetada em indivíduos idosos. Estudo experimental mostrou que a interação entre linfócitos T e B (CD40L:CD40) é reduzida com o envelhecimento, prejudicando a ativação e diferenciação dos linfócitos B, ocasionando uma diminuição na formação dos centros germinais e produção de anticorpos IgG antígeno-específico (50).

Apesar de não haver diminuição na concentração de anticorpos pós vacinação, estes apresentam menor capacidade de opsonização e consequente neutralização (50,51), afetando a qualidade da resposta imune humoral e diminuindo a eficácia nas vacinações. A vacinação contra o vírus influenza, infecção com alta morbidade e mortalidade em idosos, apresenta proteção entre 65 a 80% dos indivíduos jovens, mas somente de 30 a 50% em idosos (51- 53).

1.3.3 Imunidade Inata

Diferentemente da resposta imune adaptativa, a imunidade inata não sofre alteração quanto ao número de células, porém, a funcionalidade destas se apresentam alteradas com o envelhecimento. Os neutrófilos tem diminuição na sua capacidade fagocítica e microbicida, na produção de reativos de oxigênio e quimiotaxia (54,55). O número absoluto dos macrófagos aumenta com o envelhecimento, mas sua função é alterada. Fagocitose, quimiotaxia, expressão da molécula MHC II, sinalização e produção de reativos de oxigênio estão reduzidos, enquanto há aumento da produção de prostaglandina E2 (56). Embora haja um aumento no número de células Natural Killer (NK) e NKT, suas capacidades citotóxicas e produção de citocinas estão reduzidas (57). Em geral, o envelhecimento resulta na diminuição da função das células dendríticas (DCs) [58-61].

1.3.3.1 *Inflamm-aging*

“Inflamm-aging” é um termo utilizado para indicar a presença de uma inflamação crônica sistêmica de baixo grau que ocorre com o aumento da idade (62). Seria ocasionada por uma contínua carga antigênica e estresse, pela persistência de estímulos inflamatórios ao longo do tempo criando uma predisposição a doenças relacionadas com a idade. “Inflamm-aging” é caracterizado pelo aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF), proteína C-reativa (PCR) e diminuição de IL-10, sendo considerado como um preditor de fragilidade e fator de predisposição para o desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade como doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e Alzheimer (63-66).

1.4 Imunossenescência versus atividade física

Como discutido acima, o envelhecimento do sistema imune, particularmente a desregulação da função dos linfócitos T, parece ser parcialmente responsável pelas co-morbididades apresentadas pela população idosa. Esses indivíduos são mais suscetíveis a diferentes doenças infecciosas, a autoimunidade e câncer e respondem menos à vacinação, quando comparados a população adulta jovem. Embora seja possível que o exercício ou estilo de vida atuem como medidas que proporcionem um envelhecimento saudável, não há uma resposta clara a esta questão até o momento.

Embora o impacto do exercício sobre o sistema imunológico seja uma área de extensa pesquisa, a maioria dos estudos focaram as respostas ao exercício agudo. Estes estudos mostraram que a resposta imune ao exercício agudo é transitória e variável, sendo influenciado por uma vasta gama de fatores, tais como a intensidade, a duração e o modo de exercício, as concentrações dos hormônios durante o exercício, a mudança na temperatura do corpo, o fluxo sanguíneo, estado de hidratação e posição corporal (vertical vs. horizontal) [67,68]. A leucocitose, granulocitose e diminuição na proporção de linfócitos T e B geralmente refletem alterações no volume de sangue, desmarginação e migração para o tecido das células do sangue periférico. As subpopulações de linfócitos mostram uma diminuição da proporção de células auxiliares / supressoras e um aumento das células NK. O exercício prolongado leva a uma diminuição dos níveis séricos e salivares de imunoglobulinas [69,70]. Outros estudos mostraram que maratonistas apresentam-se com mais infecções de vias aéreas 3-72 horas após a competição ou até duas semanas após a competição [71,72]. Entretanto, poucos estudos têm abordado a resposta imune ao treinamento físico a longo prazo, principalmente em pessoas idosas. Em um estudo transversal realizado por Shinkai e cols, 1995^[73], foram avaliados 17 indivíduos idosos que praticavam atividade aeróbica regular (60,5 – 67,1 anos) e 19 idosos sedentários (62,3 – 69,3 anos). Os resultados obtidos sugerem que a atividade física aeróbica regular está associada a um menor declínio da função das células T circulantes, uma vez

que o grupo de idosos ativos demonstrou uma maior resposta proliferativa aos mitógenos fitohemaglutinina (PHA) e pokeweed (PW), e uma produção mais elevada das citocinas IL-2, IFN- γ e IL-4. A estimulação mitogênica com Phorbol 12- Myristate 13-Acetate (PMA) e ionomicina também mostrou um aumento de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ e células TCD8⁺ produtoras de IL-2 em idosos que praticavam caminhadas quando comparadas com idosos sedentárias (74). O aumento na porcentagem de células T produtoras de IL-2 também foi verificado em um grupo de idosos (62 – 86 anos) que foram submetidas a um programa de intervenção de dois anos de atividade física moderada, quando comparada ao grupo de idosos sedentárias (75).

Um aumento na expressão do CD25, a cadeia α do receptor de IL-2, em células mononucleares periféricas pós-estimulação com anti-CD3 foi verificada em idosos que praticavam atividade física moderada há mais de 15 anos quando comparadas com idosos sedentárias. Um dado interessante é que a comparação intra-grupo mostrou que quanto mais ativo o indivíduo, maior era a expressão do CD25, sendo que o oposto também acontecia (76).

Apesar dos dados mostrarem que os linfócitos T de indivíduos idosos ativos apresentam uma maior proliferação e ativação, estes foram obtidos por estimulação mitogênica, o que não invalida os dados, mas nos leva a questionar se a atividade física realmente tem impacto sobre a capacidade dos linfócitos T de reconhecer um antígeno específico e exercer sua função efetora, seja pela secreção de citocinas e ou pela ação citotóxica. Neste sentido Okutsu e cols, 2008^[77], utilizaram a hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) ao “purified protein derivative” (PPD) para avaliar o efeito de 25 semanas de treinamento físico sobre o balanço das respostas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2) em idosos. Os idosos treinados apresentaram, ao término do treinamento, um aumento na reatividade ao PPD e uma redução da concentração de soro de IgG₄, cuja a produção depende de uma resposta imune do tipo Th2. Nenhuma alteração foi verificada no grupo de sedentários. Resultados semelhantes foram obtidos na avaliação realizada por Shimizu e cols, 2008^[78], dos efeitos do treinamento físico moderado, por um período de seis meses, sobre a expressão de CD28 e do balanço de células TCD4⁺INF- γ ⁺

(Th1) e células TCD4⁺IL-4⁺ (Th2) em pessoas idosas. Após o treinamento os idosos apresentaram um aumento na expressão de CD28 em células TCD4⁺ e aumento na porcentagem de células TCD4⁺IFN- γ ⁺, mas não nas células TCD4⁺IL-4⁺, quando comparados aos indivíduos sedentários. Estes resultados apoiam a hipótese de que o treinamento físico favorece a resposta imune Th1 “in vivo” em pessoas idosas.

Além de indicar uma melhora na resposta imune adaptativa celular, a atividade física moderada parece ter um efeito positivo também sobre o sistema imune inato. Yan e cols, 2001^[79], ao estudarem indivíduos idosos que praticavam atividades físicas aeróbias duas vezes por semana durante uma hora ou mais nos últimos três anos, verificou que o número de células NK aumentou significativamente nos idosos ativos, em comparação com indivíduos sedentários com a mesma idade. A atividade fagocítica dos neutrófilos que se mostra em declínio com a idade, estava melhor preservada nos idosos ativos do que nos idosos sedentários.

A atividade física moderada (70-80% da frequência cardíaca de reserva) é associada a uma menor porcentagem de monócitos e a menor produção de TNF- α por estes ao serem estimulados com lipopolysaccharide (LPS). (80,81). Além disso, o aumento da atividade física aeróbia, praticada por idosos nos momentos de lazer, foi associada a diminuição dos níveis séricos de PCR (82,83), IL-6 (82,84), TNF- α e no número de leucócitos do sangue periférico (82). Não só a quantidade como o tempo em que a atividade física é praticada parece ter uma ação positiva sobre a concentração de marcadores inflamatórios, pois, indivíduos com idade superior a 65 anos e com histórico de atividade física regular há pelo menos 49 anos, apresentaram número de leucócitos, neutrófilos, concentrações de IL-6, IL-1 e o seu receptor antagonista (IL-1ra) e a forma solúvel do receptor-I do TNF (sTNF-RI) inferiores ao dos indivíduos idosos sedentários (85).

Spielman e cols, 2011^[86] estudaram o efeito da atividade física sobre o acúmulo de células T de memória e a diminuição do repertório células T “naive”, característico da imunossenescência. As células T de 102 homens

saudáveis (18-61 anos) foram analisadas quanto aos marcadores para o fenótipo senescente (KLRG1 e CD57), marcadores para o fenótipo “naive” (CD28 e CD45RA) e fenótipo de memória (CD45RO) expressos na superfície de células T CD4⁺ e CD8⁺. O aumento da idade foi positivamente associado com o aumento na proporção de células T CD4⁺ ou CD8⁺ senescentes (KLRG1⁺ / CD57⁺; KLRG1⁺ CD28^{neg}) e inversamente associada com as células “naive” (KLRG1^{neg}/CD28⁺). O consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) - capacidade máxima do organismo humano em transportar e fazer uso de oxigênio durante um exercício físico incremental, sendo obtido por teste ergoespirométrico e considerado um padrão “gold standard” para a medida do limite funcional do sistema cardiorrespiratório e muito utilizado na classificação e triagem de atletas (87) - foi inversamente associado com as células TCD4⁺ e TCD8⁺ senescentes. Porém, a idade deixou de ser associada as proporções de células T senescentes ou “naive” após o ajuste para VO_{2max}, enquanto a associação entre VO_{2max} e estes subconjuntos de células T resistiu ao ajuste por idade. Estes dados demonstram que a aptidão aeróbia está associada a um menor acúmulo de células T senescentes, podendo talvez destacar assim, os efeitos benéficos de um estilo de vida fisicamente ativo sobre o envelhecimento do sistema imunológico, uma vez que os indivíduos mais idosos tinham apenas 61 anos.

Além do acúmulo de células T de memória, estas apresentam uma senescência replicativa, devido ao encurtamento do telômero (34,88) que ocorre a cada divisão celular. Estudos que avaliaram o efeito da atividade física sobre o comprimento do telômero em células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) de idosos, indicam que o comprimento do telômero é preservado em idosos que realizam atividade física, tanto moderada quanto vigorosa, estando esta preservação positivamente relacionada com o VO_{2max}. Este fato está possivelmente determinado pelo aumento da atividade da enzima telomerase apresentado pelos indivíduos idosos ativos quando comparados aos indivíduos sedentários. (89,90).

Dados de dois diferentes estudos realizados por Kohut e cols (2004^[91], 2002^[92]) sugerem que a atividade física moderada a intensa em

indivíduos idosos, pode estar associada ao aumento dos títulos de anticorpos em resposta a vacina anti-influenza. Woods e cols, 2009^[93] demonstraram que uma atividade física aeróbia moderada (60 -70% consumo máximo de oxigênio), com duração de 10 meses, aumentou a soroproteção dos indivíduos idosos treinados contra o vírus Influenza quando comparados aos idosos que praticaram exercícios de flexibilidade no mesmo período.

Em contrapartida a estes dados positivos da atividade física sobre o sistema imune, Nieman e cols, 1993^[94], realizaram um estudo transversal no qual avaliaram idosas (67 - 85 anos) sedentárias, as quais foram divididas em dois grupos, sendo que um grupo realizava caminhadas, de 30 a 40 minutos em 5 dias da semana, durante 12 semanas, atingindo 60% da reserva cardíaca, enquanto o segundo grupo fazia exercícios calistênicos de movimentos leves e flexibilidade. Para a comparação do efeito da atividade física sobre a função imunológica dos grupos que sofreram a intervenção, eles utilizaram os dados obtidos com mulheres idosas, 65-84 anos, altamente condicionadas, que participavam de maratonas. No início do estudo, as idosas atletas apresentaram um maior número de células NK, com melhor função lítica, tendo também uma melhor resposta linfoproliferativa frente ao estímulo com PHA, apesar de não haver diferenças nos níveis periféricos nas subpopulações de linfócitos, quando comparadas com as idosas sedentárias. Após 12 semanas de exercício moderado, os dados obtidos permaneceram os mesmos, pois nenhum efeito sobre a atividade da célula NK ou a função linfoproliferativa das células T foi verificado, mesmo com a melhora do VO_{2max} das sedentárias em 12,6%.

Outros dois estudos com perfil de intervenção semelhante ao de Nieman, com os indivíduos sedentários sendo divididos em um grupo que realizou atividade física aeróbia moderada e outro realizando exercícios de alongamento. Porém, com um período superior de intervenção, 6 e 12 meses respectivamente, também não obtiveram dados que mostrasse algum efeito do exercício aeróbio sobre a função imunológica avaliada “in vitro”, apesar da eficácia comprovada da intervenção do exercício, com um aumento do VO_{2max} no grupo com atividade física aeróbia moderada. (95,96).

Diferentes protocolos que investigaram o efeito da atividade física de resistência (treinamento de 6 semanas a 6 meses) sobre o sistema imune de indivíduos idosos não mostraram mudanças quanto as subpopulações de linfócitos T, em relação ao número, produção de citocinas, capacidade linfoproliferativa e DTH, quando comparados ao grupo controle (idosos saudáveis sedentários) [97-99].

A avaliação de um número maior de parâmetros imunológicos foi realizada por Raso e cols (2007) [100]. Atividade citotóxica das células NK, linfoproliferação frente a estimulação com PHA e a determinação das subpopulações dos linfócitos (CD3, CD19, CD56, CD4 e CD8) e seus fenótipos (CD25, CD28, CD45RA, CD45RO, CD69, CD95 e HLA-DR) foram analisados em mulheres idosas saudáveis que participaram de um programa de atividade física moderada de resistência por 12 meses. Embora o treinamento tenha resultado em um aumento da força muscular, nenhuma alteração nos parâmetros imunológicos avaliados foi observada na comparação com o grupo controle (mulheres idosas saudáveis sedentárias).

Diante do exposto, no que diz respeito ao estudo dos efeitos da prática de atividade física na imunossenescência, os dados apresentados na literatura, revisados por nosso grupo de estudo, possuem limitações. Além de exprimir controvérsias, estes compõem, em sua maioria, estudos intervencionistas com avaliações de curtos períodos de atividade física, havendo um pequeno número de estudos que avaliam a atividade física crônica. Além disto, muitos dos estímulos estudados para se analisar a proliferação celular são inespecíficos, fato que dificulta a compreensão dos mecanismos envolvidos na imunossenescência. Neste contexto, não há relatos na literatura sobre o papel da atividade física regular/crônica no padrão de secreção de citocinas, na resposta proliferativa a um estímulo específico e no encurtamento do telômero em subpopulações específicas da imunidade adaptativa, como $\text{TCD4}^+\text{CD45RO}^+$ (memória) $\text{TCD4}^+\text{CD45RA}^+$ (“naive”) ou $\text{TCD8}^+\text{CD28}^+$ e CD28^{neg} , em indivíduos idosos.

Por fim, o desenvolvimento de novos estudos que procurem auxiliar na compreensão dos mecanismos básicos da disfunção imune, em decorrência do envelhecimento, é de grande importância médica e de saúde pública.

II – OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da imunossenescência de idosos, com ênfase na resposta imune adaptativa.

2.1.1 Específicos

Avaliar em idosos submetidos à treinamento moderado regular e em idosos não treinados:

- a capacidade de resposta linfoproliferativa dos linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ estimulados com antígeno e mitógeno;
- o perfil de produção de citocinas imunorreguladoras (IL-2, IL-10, TNF e INF- γ) de subpopulações de linfócitos T estimulados com antígenos e mitógenos;
- os níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF e IL-12p70) com a finalidade de caracterizar o estado subclínico “pró-inflamatório”;
- o comprimento do telômero, em subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ (memória) e T CD4⁺CD45RO^{neg} (“naive”) e subpopulações de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28^{neg},

- a expressão de marcadores de apoptose (caspase-3 e Bcl-2) em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (memória e “naive”) e subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (CD28⁺ e CD28^{neg});
- a frequência das subpopulações dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no sangue periférico;
- a produção de anticorpos anti-influenza.

III - CASUÍSTICA

Foram incluídos neste estudo 36 indivíduos idosos do sexo masculino na faixa etária de 65 a 85 anos, sendo 15 idosos não treinados (NT), em acompanhamento no ambulatório de Geriatria do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-FMUSP), sob a coordenação do Prof. Luiz Eugênio Garcez Leme, e 21 indivíduos idosos treinados moderadamente (TM), participantes do Programa Saber Viver da Secretária de Esportes da cidade de Cotia, Clube Paineiras, Associação Atlética da FMUSP e Corpore do Brasil. As atividades físicas praticadas incluem: vôlei adaptado, basquete ou corrida (treinamento para participação de provas de até 10.000 metros). Foram excluídos do estudo indivíduos idosos que apresentaram co-morbidades de impacto para o sistema imunológico (AIDS, mieloma, artrite reumatoide etc.) e/ou que fizeram uso de medicamentos imunossupressores (ex. corticosteroides), tabagistas e alcoolistas.

Foram incluídos no estudo indivíduos idosos portadores de co-morbidades e/ou em tratamentos destas, porém sem repercussão significativa para o sistema imunológico (ex. hipertensão controlada, diabetes mellitus 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 0805/11. Foram obtidos os consentimentos informados de todos os participantes do estudo.

IV – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Avaliação Clínica

Ambos os grupos tiveram sua condição clínica avaliada através de exame clínico e avaliação geriátrica ampla (AGA), a qual foi realizada com a aplicação dos seguintes questionários: Miniavaliação Nutricional (MAN) [101], Mini Exame do Estado Mental (MEEM) [102] para avaliação cognitiva e de humor e o “Medical Outcomes Study 36 – item short healthy survey (SF-36)” em sua versão brasileira (103), que permite a avaliação dos aspectos da qualidade de vida que estão diretamente relacionados à saúde do indivíduo. Do ponto de vista complementar foram avaliados parâmetros laboratoriais básicos (glicemia, hemograma, ureia e creatinina, enzimas hepáticas, hormônios tireoidianos e sexuais e sorologia anti-CMV) realizados na Divisão do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, avaliação de força muscular através de teste isocinético, de equilíbrio através de plataforma de força e de condição aeróbia através de teste ergoespirométrico.

4.2 Coleta e processamento das amostras

Foram coletados 100 mL de sangue periférico, divididos em duas coletas (sendo 50 ml em cada uma), de cada indivíduo participante do estudo, em tubo estéril contendo heparina como anticoagulante. A coleta de sangue no grupo treinado foi conduzida com ≥ 48 h após a última sessão de treinamento.

As amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) utilizando o método de gradiente de densidade Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Reino Unido). 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 x g durante 20 minutos a 19°C, com a utilização do freio três (Beckman Model J-6B centrifuge, EUA). 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 x g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas com um ml de meio de cultura RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro AB humano (Sigma, Steinheim, Alemanha). A contagem das células foi realizada com a utilização de um contador hematológico automático (Abbott Cell Dyn 1400 USA). A viabilidade celular foi realizada pela adição de Azul de Trypan, considerando a viabilidade celular mínima acima de 90%.

4.3 Cultura de PBMC para avaliação de linfócitos e secreção de citocinas

A proliferação dos linfócitos frente à estimulação foi determinada a partir da positividade para a marcação da proteína nuclear Ki67, a qual participa da regulação da divisão celular (104). Assim, a suspensão de PBMCs, obtida pelo gradiente Ficoll® Paque Plus de sangue periférico heparinizado, foi cultivada em placas de 24 alvéolos (Costar, EUA) em volume de um ml, contendo 3×10^6 de células, em meio RPMI 1640, enriquecido a 10% de soro AB humano (Sigma, Steinheim, Alemanha), e suplementado de gentamicina (10 µg/mL) [Novafarma, Brasil]. 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, EUA), e seis dias para o estímulo com um lisado viral de Citomegalovírus (CMV) 400 ng/mL (doado 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 Cytotfix/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 x g (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, EUA), 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], um por cento de soro fetal bovino [SFB], 0,09% de azida sódica, filtrado com pH entre 7,4 – 7,6) centrifugando a 250 x g (Hermle Z200 M/H, Alemanha) por cinco minutos. As células foram ressuspensas em 50 µl de tampão de marcação contendo 2,5µl do anticorpo anti-CD3 marcado com BD Horizon V500 (BD Biosciences, EUA), 2,5µl do anticorpo anti-CD8 marcado com APC-Cy7 (BD Biosciences, EUA), 20 µl do anticorpo anti-CD45RO marcado com PE-Cy5 (BD Biosciences, EUA), 2,5µl do anticorpo anti-CD28 marcado com APC (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 BD 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 (Hermle Z200 M/H, Alemanha) por cinco minutos. As células foram ressuspensas em 50 µl de BD Perm/Wash™ (BD Biosciences, EUA) contendo 2,5µl do anticorpo anti-CD4 marcado com BD Horizon V450 (BD Biosciences, EUA) e 5 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™ (BD Biosciences, EUA) centrifugando a 250 x g (Hermle Z200 M/H, Alemanha) 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, com o citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 7.6.4 seguindo a estratégia de “gates” demonstrada na Figura 1.

Fig. 1. Estratégia de “gates” para a análise da linfoproliferação. (A) Sequência de dependências dos “gates”, as setas em vermelho indicam a dependência. As células não estavam marcadas com o anticorpo anti-Ki67. (B) Histogramas representativos da marcação para o anticorpo anti-Ki67 nas subpopulações TCD4⁺ (“naive” = CD4⁺CD45RO^{neg} e memória= CD4⁺CD45RO⁺) e TCD8⁺ (senescente= CD8⁺CD28^{neg} e não senescente= CD8⁺CD28⁺) na condição basal. (C) Histogramas representativos da marcação para o anticorpo anti-Ki67 nas subpopulações TCD4⁺ (“naive” = CD4⁺CD45RO^{neg} e memória= CD4⁺CD45RO⁺) e TCD8⁺ (senescente= CD8⁺CD28^{neg} e não senescente= CD8⁺CD28⁺) estimuladas com PHA. (D) Histogramas representativos da marcação para o anticorpo anti-Ki67 nas subpopulações TCD4⁺ (“naive” = CD4⁺CD45RO^{neg} e memória= CD4⁺CD45RO⁺) e TCD8⁺ (senescente= CD8⁺CD28^{neg} e não senescente= CD8⁺CD28⁺) estimuladas com CMV.

4.4 Dosagens de citocinas

4.4.1 Em sobrenadantes de cultura

Para a dosagem de IL-2, IL-10, IL-6, IL-4, TNF e IFN- γ em sobrenadantes de cultura, PBMCs foram cultivadas de acordo com o item 4.3, na presença dos estímulos especificados e meio de cultura somente (controle), em volume final de 1,0 ml em placas de 24 alvéolos. Os sobrenadantes foram coletados com 24 horas para dosagem de IL-2 e TNF e 120 horas de cultivo para as citocinas IL-10, IL-6, IL-4 e IFN- γ . Os sobrenadantes foram centrifugados a 300 x g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente para eliminar debris celulares, aliquotados e conservados a -70°C até dosagem das citocinas, sendo as alíquotas descartadas após o descongelamento para a dosagem. Para estas dosagens foi utilizado o kit Human Th1/Th2 Cytometric Bead Array (CBA) [Cat nº 551809 - BD Biosciences, EUA], seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Resumidamente, as amostras de sobrenadantes 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 em citômetro de fluxo, (LSRFortessa -BD Biosciences) e os

resultados foram gerados em formato de gráfico e tabular utilizando o BD FCAPArray 3.0 (BD Biosciences,EUA).

4.4.2 No soro

Para a dosagem dos níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF e IL-12_{p70}) utilizamos os soros dos indivíduos participantes coletados em tubo seco (BD Biosciences, EUA) e separados por centrifugação de 300 x g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos à temperatura ambiente, e conservados a -70°C até a dosagem das citocinas, sendo as amostras descartadas após o descongelamento para a dosagem. Para as dosagens foram utilizados kits do Cytometric Bead Array (CBA): Human IFN- γ enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561515 - BD Biosciences, EUA), Human IL-6 enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561512 - BD Biosciences, EUA), Human IL-1 β enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561509 - BD Biosciences, EUA), Human IL-10 enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561514 - BD Biosciences, EUA), Human TNF enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561516 - BD Biosciences, EUA), Human IL-8 enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561513 - BD Biosciences, EUA), Human IL-12_{p70} enhanced sensitivity flex set (Cat nº 561518 - BD Biosciences, EUA), 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 PE. A aquisição das amostras foi realizada em citômetro de fluxo, (LSRFortessa -BD Biosciences) e os resultados foram gerados em formato de gráfico e tabular utilizando o BD FCAPArray 3.0 (BD Biosciences).

4.5 Separação Celular

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 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, Miltenyi 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, Reino Unido), foi considerado como grau mínimo de pureza de 90% (Figura 2).

Fig. 2. Purificação de linfócitos TCD4⁺. A) porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) pureza dos linfócitos TCD4⁺ pós-purificação.

4.5.2 Obtenção de linfócitos TCD4⁺ de memória (CD45RO⁺) e TCD4⁺ “naive” (CD45RO^{neg})

O produto da primeira purificação (células TCD4⁺) foi submetido a uma segunda purificação, para obtenção das células de memória (CD45RO⁺). Para isto, utilizamos a seleção magnética positiva de células TCD4⁺ expressando CD45RO⁺ (marcador de células de memória). Neste procedimento, as células CD45RO⁺ foram magneticamente marcadas com microesferas de anti-CD45RO na concentração de 20µl para cada 10⁷ células (CD45RO Microbeads human, Miltenyi Biotec, Alemanha). Após a incubação de 15 minutos a 4-8°C e lavagem (centrifugação de 300 x g [Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha] por 10 minutos com solução tampão contendo PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA), as células foram acondicionadas em coluna

magnética (MS, Miltenye Biotec, Alemanha). Após a passagem da solução contendo as células, a coluna foi retirada do campo magnético e as células de interesse foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (LTCD4⁺ CD45RO^{neg}), “naive”, também foram recolhidas.

Os linfócitos TCD4⁺ de memória purificados foram marcados com os anticorpos de superfície anti-CD45RO-PeCy5 (BD Biosciences, EUA) para análise da pureza, a qual foi realizada em citômetro de fluxo (LSRFortessa™ - BD) [Figura 3].

Fig. 3. Obtenção de linfócitos TCD4⁺ de memória (CD45RO⁺) e de linfócitos TCD4⁺ “naive” (CD45RO^{neg}). A) pureza dos linfócitos TCD4⁺ de memória (CD45RO⁺). B) pureza dos linfócitos TCD4⁺ “naive” (CD45RO^{neg}).

4.5.3 Purificação de linfócitos TCD8⁺

A partir das PBMCs purificamos os linfócitos TCD8⁺ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD8 (CD8⁺ T Cell Isolation Kit 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 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 anticorpos monoclonais conjugados com microesferas magnéticas). Após lavagem com centrifugação de 300 x g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos com solução tampão (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA), as células foram acondicionadas em coluna magnética (LD, Miltenye Biotec, Alemanha), ocorrendo à depleção das células magneticamente marcadas. A pureza destas células foi avaliada empregando-se citometria de fluxo com três cores (CD3/CD4/CD8; Serotec, Oxford, Reino Unido), foi considerado como grau mínimo de pureza de 90% (Figura 4).

Fig. 4. Purificação de linfócitos TCD8⁺. A) porcentagem dos linfócitos pré-purificação. B) pureza dos linfócitos TCD8⁺ pós-purificação.

4.5.4 Obtenção de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28^{neg}

O produto da primeira purificação (células T CD8⁺) foi submetido a uma segunda purificação, para obtenção das células T CD8⁺ que expressam CD28⁺, através de uma seleção positiva. Neste procedimento, as células CD28⁺ foram marcadas com CD28 PE na concentração de 10µl para cada 10⁷ células. Posteriormente, as células foram marcadas com microesferas anti-PE na concentração de 20µl para cada 10⁷ células (CD28 Microbead Kit human, Miltenyi Biotec, Alemanha). Após a incubação de 15 minutos a 4-8°C e lavagem (centrifugação de 300 x g [Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha] por 10 minutos com solução tampão contendo PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA), as células foram acondicionadas em coluna magnética (MS, Miltenyi Biotec, Alemanha). Após a passagem da solução contendo as células, a coluna foi retirada do campo magnético e as células de interesse (TCD8⁺ CD28⁺) foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (TCD8⁺ CD28^{neg}), também foram recolhidas.

Os linfócitos TCD8⁺ CD28 purificados foram marcados com os anticorpos de superfície anti-CD28-PE (*BD Biosciences, EUA*) para análise da pureza, a qual foi realizada em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (*BD Biosciences, EUA*) [Figura 5].

Fig. 5. Obtenção de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28^{neg}. A) pureza dos T CD8⁺CD28⁺. B) pureza dos linfócitos T CD8⁺CD28^{neg}.

4.6 Hibridação *in situ* Fluorescente com análise por citometria de fluxo (Flow-FISH)

Para a medida 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 (105). Batliwalla e colaboradores (2001) ^[106] e Ruffer e colaboradores (1998) ^[107], descreveram um método quantitativo de hibridação “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 (108). 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 hibridação

(contendo, dentre outros reagentes, uma sonda específica para o telômero FITC-PNA (C_3TA_2)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 denaturação do DNA cromossômico) e hibridadas a 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 hibridação “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 4.5, e divididos em dois tubos eppendorfs (A e B) de 1,5 ml na concentração de 1×10^6 células, a cada tubo foram adicionadas na concentração de 1×10^6 células de linhagem tumoral 1301. Tais células são utilizadas como controle interno da técnica, uma vez que possuem telômeros longos e são tetraploides. Estas foram gentilmente cedidas pela Dra Juliana Pereira e Msc. Graciela Ap. Brocardo do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas, e mantidas em cultura celular contendo meio RPMI 1640 (contendo antibiótico, fungicida e 10% de SFB). 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 hibridação contendo 70% de formamida e as células do tubo B foram ressuspensas em uma solução de hibridação contendo 70% de formamida mais a “probe” (sonda) específica para o telômero FITC-PNA (C_3TA_2)₃. As amostras foram aquecidas a 82°C por 10 minutos para desnaturação, seguida de hibridação 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 (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha), 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 A 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), de acordo com a estratégia de “gates” demonstrada na Figura seis. A determinação do comprimento relativo dos telômeros (RTL) foi realizada a partir do seguinte cálculo:

(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 x100

RTL=_____

(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 x100

Exemplificando, se substituirmos os valores como abaixo, temos:

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

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). A porcentagem foi convertida em Kbp, usando o comprimento dos telômeros conhecido (23,48 Kpb) das células de linhagem tumoral 1301 (105).

Fig. 6: Avaliação do comprimento do telômero de linfócitos TCD8⁺ (purificados por seleção magnética) utilizando células controle 1301. A) refere-se às células hibridadas sem a “probe”. B) refere-se às células hibridadas com a “probe”. “Gate” eletrônico em SSC x FSC delimita os linfócitos TCD8⁺ e as células 1301; “Gates” eletrônicos em FITC x PI delimitam os linfócitos TCD8⁺ 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 iodeto de propídeo; FL₁ em escala logarítmica representando o sinal fluorescente da “probe” (PNA/FITC).

4.7 Análise da expressão de marcadores de apoptose

A avaliação da apoptose “in vitro” foi realizada nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (memória e “naive”) e subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (CD28⁺ e CD28^{neg}) 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 (BD Biosciences, EUA), anti-CD4 marcado com BD Horizon V450 (BD Biosciences, EUA), anti-CD8 marcado com APC-Cy7 (BD Biosciences, EUA), anti-CD45RO marcado com PE-Cy5 (BD Biosciences, EUA), anti-CD28 marcado com APC (BD Biosciences, EUA), anticorpo anti-caspase-3 marcada

com PE (BD Biosciences, EUA) e o anticorpo monoclonal purificado de camundongo anti-humano Bcl-2 marcado com FITC (BD Biosciences, EUA). A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, com o citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 7.6, seguindo a estratégia de “gates” demonstrada na Figura 7.

Fig. 7. Estratégia de “gates” para a análise da apoptose “in vitro”. Sequência de dependências dos “gates”, as setas em vermelho indicam a dependência. (A) Histogramas representativos da marcação para os anticorpos anti-caspase-3 e anti-Bcl2 nas subpopulações TCD4⁺ (“naive” = CD4⁺CD45RO^{neg} e memória = CD4⁺CD45RO⁺) estimulados com PHA. (B) Os linfócitos TCD8⁺ (senescente = CD8⁺CD28^{neg} e não senescente = CD8⁺CD28⁺) estimulados com PHA.

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

Para a fenotipagem dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico foram coletados cinco ml de sangue em tubo contendo EDTA (BD Biosciences, EUA) dos idosos de ambos os grupos. A marcação das células foi realizada da seguinte forma: em tubos para citometria (BD Biosciences, EUA) foi pipetado 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-CD45RO marcado com PE-Cy5, anti-CD28 marcado com APC, anti-CD45RA marcado com FITC e anti-CCR7 marcado com PE-Cy7, todos da BD Biosciences, EUA) seguido da pipetagem de 70 µl do sangue em cada tubo. A amostra foi incubada ao abrigo da luz por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao término do período de incubação foram adicionados 250 µl da solução Optilyse C™ (Beckman Coulter, EUA) para lise das hemácias, incubando ao abrigo da luz por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao término do período de incubação foram adicionados 500 µl da solução BD FACSFlow™ (BD Biosciences, EUA) em cada amostra e realizou a lavagem das células, centrifugando as amostras a 300 x g (Centrifuge 5810R, Eppendorf, Alemanha) por 10 minutos a temperatura ambiente. Uma segunda lavagem foi realizada, e ao término desta as células foram ressuspensas em 500 µl da solução BD FACSFlow™ (BD Biosciences, EUA) . A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo, com o citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 7.6.4 (Treestar Inc, OR, EUA)., seguindo a estratégia de “gates” demonstrada na Figura 8.

Fig. 8. Estratégia de “gates” para a fenotipagem dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico. Subpopulações analisadas: Memória Central (MC) = CCR7⁺CD45RA^{neg}; “naive” = CCR7⁺CD45RA⁺; Memória Efetora (ME) = CCR7^{neg}CD45RA^{neg}; Memória Efetora re-expressando CD45RA (T_{emra}) = CCR7^{neg}CD45RA⁺.

4.9 Coleta de soro para quantificação de anticorpos anti-*Influenza*

Durante as campanhas nacionais contra a gripe realizada em Abril de 2012 e 2013, realizamos a coleta do soro dos indivíduos idosos de ambos os grupos, antes da vacinação, seis semanas e seis meses pós-vacinação, para avaliarmos a cinética de produção e queda dos títulos de anticorpos anti-*Influenza*. A determinação do título de anticorpo foi realizada pela técnica de Hemaglutinação, sendo que títulos ≥ 40 foram considerados como protetores (109), realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) em colaboração com a Dra Clarice Machado.

V – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos para a comparação entre os grupos de idosos treinados moderadamente e idosos não treinados, o teste de *Mann-Whitney* para os dados não paramétricos e o *Unpaired t test* na comparação dos dados paramétricos. Para a comparação intra-grupos, utilizamos o *Paired test*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando apresentaram o $p < 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado o “software” GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

VI- RESULTADOS

6.1 Dados demográficos, antropométricos e laboratoriais

Foram incluídos 36 indivíduos saudáveis do sexo masculino, sendo 15 idosos não treinados (NT) e 21 idosos treinados moderadamente (TM). Ambos os grupos apresentaram equivalência em relação à idade e ao IMC (Tabela 3).

Tabela 3: Dados dos grupos de estudo

	NT	TM
	<i>n</i> = 15	<i>n</i> = 21
Idade (anos)	70 (68,0 – 78,0)	69 (67,5 - 72,5)
IMC	25.95 (22,6 – 28,1)	24,9 (23,0 – 26,5)
MAN	25 (23,75 – 26,88)	25.7 (23,75 – 28,0)
MEEN	27 (24,0 – 28,0)	29 (27,5 – 30,0)

Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75). MAN (101): sem desnutrição 24 pontos; risco de desnutrição 23.5 – 17 pontos; desnutrição < 17 pontos. MEEN (102): Intacta 25 – 30 pontos; Leve 21 – 24 pontos; Moderada 10 – 20 pontos; Grave ≤ nove pontos.

Os indivíduos incluídos no estudo não apresentaram comorbidades e nem faziam uso de medicação que apresentassem impacto sobre o sistema imunológico. Assim, dentre os indivíduos idosos NT, 25% apresentaram

hipertensão arterial sistêmica (HAS), 12,5% apresentaram Diabetes mellitus tipo II (DM) e 12,5% apresentaram hipotireoidismo. No grupo dos indivíduos idosos TM, 48% apresentaram HAS e 20% apresentaram DM. Porém, em todos os casos o DM e/ou a HAS estavam em seguimento regular e controlados.

A análise do SF-36 mostrou que os indivíduos idosos de ambos os grupos apresentaram compatibilidade nas oito dimensões abordadas, variando entre muito bom a excelente (Tabela 4). Baseados na mediana da pontuação atingida no MEEM, nenhum dos grupos apresentou perda cognitiva, um dado que clinicamente poderia ser um indicativo de demência. Porém, ao analisar os percentis (25 – 75) verificamos que o range da pontuação no grupo de idosos NT começa com 24 pontos, indicando uma perda leve da cognição. Assim, a análise individual mostrou que cinco dos 15 indivíduos NT apresentaram pontuação entre 21 a 24 pontos, sendo que o mesmo não foi verificado no grupo de idosos TM, o qual apresentou uma pontuação maior do que o grupo NT ($p= 0,0017$). Ambos os grupos não apresentaram risco de desnutrição ou desnutrição de acordo com o MAN (Tabela 3).

Tabela 4: Dados do SF-36

	NT <i>n</i> = 15	TM <i>n</i> = 21
Capacidade Funcional	85 75 - 95	95 88,75 - 100
Limitação Física	100 50 - 100	100 93,75 - 100
Dor	79 56,25 - 100	81 65,5 - 100
Estado Geral Saúde	77 68,25 - 87	82 70,75 - 92,75
Vitalidade	75 62,5 - 90	77,5 70 - 90
Aspectos Sociais	93,75 62,5 - 100	100 87,5 - 100
Aspectos Emocionais	100 33 - 100	100 100 - 100
Saúde Mental	80 69 - 95	80 71 - 88

Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75); Classificação: Excelente 100 – 89%, Muito Bom 88 – 69%, Bom 68 – 41%, Ruim 40 – 21%, Muito ruim ≤ 20%.

A avaliação dos parâmetros laboratoriais básicos dos indivíduos idosos de ambos os grupos mostraram que suas funções hepáticas, renais, endócrinas e metabólicas encontravam-se dentro da normalidade para a faixa etária (Tabela 5).

Tabela 5: Dados laboratoriais básicos

	NT <i>n</i> = 15	TM <i>n</i> = 21	Valores de Referência*
Glicemia	96 (73 - 122)	88 (75 - 102)	Acima de 60 anos: 80 - 115 mg/dL
Hemograma			
hemoglobina	14,65 (14,25 - 15,9)	15,4 (14,35 - 15,9)	13 - 18 g/dL
leucócitos	6,3 (5,5 - 6,9)	6,6 (5 - 8)	4 - 11 mil/mm3
Enzimas Hepáticas			
ALP	20,5 (15,5 -25,25)	22 (19 - 26,5)	< 41 U/L
FA	57 (48 - 67,5)	63 (48 - 101)	40 - 129 U/L
ALO	21 (16,75 - 23,5)	22,5 (19 - 26,75)	< 37 U/L
GAMA GT 8	20 (18 - 30,25)	27 (20 - 36)	8 - 61 U/L
Função renal			
Creatinina	0,98 (0,89 - 1,0)	1 (0,92 - 1,18)	0,7 - 1,20 mg/dL
Ureia	36 (31 - 43)	41,5 (32,75 -47,25)	10 - 50 mg/dL
Hormônios			
TSH	2,9 (1,35 - 4,47)	2,08 (1,62 - 3,46)	0,27 - 4,2 UI/ml
T4 livre	1,2 (1,0 - 1,35)	1,12 (0,96 - 1,24)	0,93 - 1,70 ng/dL
PTH	43 (20,25 - 61)	47 (44 - 76,25)	16 - 87 pg/mL
Testosterona livre	198 (172 - 293)	268,5 (201 - 370,3)	131 - 640 pmol/L

Colesterol - LDL**113**
(93 - 131)**120**
(90 - 141)Sem risco: inferior a 130 mg/dL
Risco moderado: 130 a 159 mg/dL
Risco elevado: superior a 159 mg/dL**Triglicérides****87**
(63 - 183)**108**
(93 - 173)Desejável: inferior a 150 mg/dL
Limítrofe: 150 a 200 mg/dL
Elevado: 200 a 499 mg/dL
Alto risco: superior a 500 mg/dL

* Valores de referência da Divisão de Laboratório Central HCFMUSP. Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75). ALP- alanina aminotransferase; FA- fosfatase alcalina; ALO- aspartato aminotransferase; GAMA GT- gamaglutamil tranferase; TSH- hormônio tiroestimulante; T4 livre- tiroxina livre; PTH- paratormônio.

O nível de atividade física foi determinado pelo emprego do Questionário Internacional de nível de Atividade Física (IPAQ – versão longa). O resultado obtido foi convertido para equivalente metabólico (MET). MET é a relação entre a taxa metabólica de trabalho e a taxa metabólica basal. Um MET é definido como 1 kcal/ kg/hora, equivalente ao custo de energia gasta para se manter sentado calmamente, podendo ser definido também, como a absorção de oxigênio, em ml/kg/min, igual ao custo do oxigênio consumido quando se está sentado quieto, equivalente a 3,5 ml/kg/min. A classificação dos grupos baseado nos MET's foi feita de acordo com os "Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) – short and long forms" disponível in: www.celafiscs.org.br, sendo que os indivíduos idosos que apresentaram uma pontuação menor que 600 MET-min/semana ou não relataram a prática de nenhuma atividade física foram considerados como "low intensity", ou seja, com uma baixa intensidade de atividade física (não treinados) [110,111]. Os indivíduos idosos que apresentaram uma pontuação entre 600 a 2999 MET-min/semana foram considerados "moderate intensity", ou seja, com um treinamento moderado. A comparação da pontuação obtida com o IPAQ mostra a diferença do gasto calórico semanal entre os indivíduos idosos estudados decorrente da atividade física ($p < 0,0001$) [Fig. 9], porém sem

diferença de gasto calórico durante o período que estes idosos permaneciam sentados (em repouso por semana: mediana de 23 horas/semana no grupo de idosos NT e de 21 horas/semana no grupo de idosos TM).

Fig. 9: Divisão dos grupos baseado no IPAQ. A) Gasto calórico semanal. B) Tempo gasto sentado em horas por semana. NT= idosos não treinados $n= 15$; TM= idosos treinados moderadamente, $n= 21$. Cada símbolo representa um indivíduo idoso. Os traços representam à mediana e percentis (25 – 75). * $p < 0,0001$.

Para corroborar o dado de melhor condicionamento físico dos idosos TM em relação ao NT obtido pela aplicação do questionário, empregamos o teste ergoespirométrico de Heck modificado. Este foi realizado pelo fisiologista Dr. Paulo Roberto Silva no Laboratório do Estudo do Movimento (LEM) no IOT, sendo que o mesmo é utilizado como teste “gold standard” para a medida do limite funcional do sistema cardiorrespiratório em atletas (112 – 114).

O resultado desta avaliação mostra, como esperado, um VO_{2max} significativamente maior no TM (medianas de 30 vs 24, $p < 0.0001$) observando-se entretanto um “overlap” entre os grupos. A presença de um “overlap” pode ter ocorrido por fatores genéticos, pois estes determinam em até 50% o valor do VO_{2max} (114). A ausência de valores de referências de VO_{2max} nesta faixa etária, como medida do condicionamento físico dos indivíduos de no nosso estudo, nos levou a inclusão de um grupo de idosos (65–85 anos) com atividade física de alto desempenho aeróbico regular (corredores de fundo em

provas acima de 15000 metros, incluindo meias-maratonas e maratonas) [TI], participantes de outro protocolo de pesquisa do nosso grupo. Verificamos que os idosos ativos de nosso estudo realmente possuem uma atividade física moderada, ou seja, intermediária entre os idosos não treinados e os idosos treinados intensamente, confirmando a divisão dos grupos. Sendo que está foi praticada de forma crônica, uma vez que a média do período em treinamento foi de 15 ± 3 anos, variando de cinco a > 30 anos.

Fig.10. Dados do teste ergoespirométrico. Os dados do $VO_{2\max}$ confirmaram a divisão dos indivíduos idosos entre não treinados (NT) e treinados moderadamente (TM). TI idosos treinados intensamente. Os traços representam à mediana e percentis (25 – 75). * $p = 0,0003$; ** $p = 0,0024$.

Os parâmetros imunológicos foram determinados em 15 idosos NT e 16 idosos TM. Os 16 indivíduos TM foram selecionados aleatoriamente do grupo composto por 21 indivíduos.

6.2 Fenotipagem dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no sangue periférico

A principal característica da imunossenescência é a mudança da composição celular do compartimento dos linfócitos T, com uma diminuição do número de células com o fenótipo “naive” e consequente aumento do número de células com fenótipo de memória. Apesar de estudos experimentais mostrarem que o envelhecimento biológico natural é acompanhado por um aumento no número de células-tronco hematopoiéticas, estas células se apresentam comprometidas com a linhagem mieloide, diminuindo assim a progênie linfóide (115). Outro fator que favorece a diminuição do número de linfócitos T “naive” é a involução tímica, que impede a maturação dos timócitos vindos da medula óssea (23-25). Com o intuito de verificar a composição celular dos idosos participantes, e se a atividade física aeróbia moderada regular apresenta algum impacto sobre esta composição, determinamos o fenótipo dos linfócitos T e suas subpopulações no sangue periférico.

A mediana das porcentagens dos linfócitos T totais foi de 63,9 no grupo dos idosos NT e de 67,1 no grupo dos idosos TM. Para as subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺ as medianas foram de 33,8 e 17 no grupo de idosos NT e de 35 e 17,6 no grupo dos idosos TM, respectivamente. As populações de linfócitos se apresentaram dentro da faixa de normalidade em ambos os grupos de estudo (dados apresentados na tabela 6). A análise individual dos grupos mostra que 46,7% (7/15) dos idosos não treinados (NT) apresentam porcentagens de linfócitos T inferiores a 60%, não ocorrendo em nenhum dos idosos TM ($p=0,0024$). Em relação à porcentagem de linfócitos TCD4⁺, 26,7% (4/15) dos idosos não treinados e 37,5% (6/16) dos idosos treinados moderadamente apresentaram valores inferiores ao valor mínimo de referência. Entre os idosos não treinados, 40% (6/15) apresentaram porcentagens de linfócitos TCD8⁺ inferiores ao valor de referência mínimo, enquanto que nos idosos TM a porcentagem foi de 17,75 (4/16). Estas diferenças numéricas não foram estatisticamente significativas.

Tabela 6: subpopulações de linfócitos T do sangue periférico

	NT	TM	
	(n=15)	(n=16)	Valores de referência*
% CD3⁺	63,9** (56,1 – 72,9)	67,1 (62,6 – 70,4)	60 - 87
% CD3⁺CD4⁺	33,8 (29,4 – 40,3)	35 (27,2 – 42,9)	32 - 61
%CD3⁺CD8⁺	17 (12,8 – 29,2)	17,6 (14 – 22,2)	14 - 43

* Valores de referência retirados da referência 116. ** Dados apresentados em medianas e percentis (25 – 75).

A imunossenescência também está relacionada ao surgimento do perfil de risco imunológico (IRP). O IRP ocasionaria um aumento da mortalidade em dois anos entre indivíduos idosos (homens e mulheres), e foi associado à infecção latente por CMV, sendo caracterizado pela inversão da relação CD4/CD8 e à expansão de linfócitos T de memória efetora terminalmente diferenciados (T_{emra}), linfócitos T que re-expressam a molécula CD45RA (40,41).

Em nosso estudo, 93,7% dos idosos não treinados (14/15) e 87,5% dos idosos treinados moderadamente (14/16) apresentaram sorologia positiva para CMV. A análise individual demonstrou que apenas 20% dos idosos NT (3/15) apresentaram relação CD4/CD8 menor que um, enquanto nos idosos TM essa porcentagem foi de 6,25% (1/16). Porém, ao contrário do relatado na literatura, a comparação intragrupo das subpopulações de linfócitos T mostrou que em ambos os grupos de estudo a porcentagem de linfócitos TCD4⁺ foi maior que a de linfócitos TCD8⁺, com uma relação de aproximadamente dois,

não houve diferença estatística nas porcentagens de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ na análise entre os grupos (Fig. 11).

Fig. 11. Análise dos linfócitos T periféricos. A) Análise das subpopulações T CD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico. NT= idosos não treinados ($n = 15$), TM = idosos treinados moderadamente ($n = 16$). B) Relação CD4: CD8. Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

A análise da distribuição das células “naive” (CCR7⁺CD45RA⁺), memória central (MC = CCR7⁺CD45RA^{neg}), memória efetora (ME = CCR7^{neg}CD45RA^{neg}) e memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA} = CCR7^{neg}CD45RA⁺) para os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, demonstrou que a maior porcentagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são linfócitos de memória em ambos os grupos, sendo que os idosos NT apresentaram uma maior porcentagem de linfócitos TCD4⁺ “naive” quando comparados com os idosos TM ($p = 0,018$). Na comparação da porcentagem de linfócitos TCD8⁺ “naive” entre os grupos, verificou-se semelhança entre as frequências das células. Dentro do compartimento dos linfócitos de memória, a análise demonstrou que houve o predomínio de células MC, tanto nos linfócitos TCD4⁺ como TCD8⁺, em ambos os grupos, seguida ME e T_{EMRA} (Fig. 12). A comparação de frequências destas células entre os grupos revelou que os idosos TM apresentaram uma maior porcentagem de linfócitos TCD4⁺ MC (mediana de 69, 2%, $p = 0,0076$) e uma menor porcentagem de linfócitos TCD4⁺ T_{EMRA} (mediana de 1,2%, $p = 0,0005$), quando comparados ao grupo de idosos NT (respectivamente medianas de 50% e 3,7%). Por outro lado, as porcentagens de linfócitos TCD4⁺ ME não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Fig. 12). Na

subpopulação TCD8⁺, as medianas para as porcentagens de células MC e T_{EMRA} sugeriram que estas são maiores e menores, respectivamente, no grupo TM, porém sem atingir significância estatística entre os grupos. As porcentagens para a subpopulação ME dos linfócitos CD8⁺ foram semelhantes entre os grupos (Fig. 12).

Fig 12. A análise da distribuição das células “naive” (CCR7⁺CD45RA⁺), memória central (MC= CCR7⁺CD45RA^{neg}), memória efetora (ME= CCR7^{neg}CD45RA^{neg}) e memória efetora terminalmente diferenciada (TEMRA = CCR7^{neg}CD45RA⁺) nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. NT = idosos não treinados, TM= idosos treinados moderadamente. *n* NT = 15, *n* TM =16. Dados apresentados em mediana.

O acúmulo de linfócitos T que não expressam a molécula CD28, principalmente na subpopulação de linfócitos TCD8⁺, é também uma alteração que ocorre durante o processo natural de envelhecimento. A molécula coestimuladora CD28 é essencial para a ativação dos linfócitos T, por amplificar o sinal dos receptores antigênicos (TCR). CD28 é expresso constitutivamente nos linfócitos T, entretanto, a ativação dos linfócitos T conduz a uma regulação negativa na expressão do CD28, resultando assim na presença de linfócitos TCD28^{neg}, depois de repetidos estímulos antigênicos. Na

Figura 13 observa-se que a proporção de linfócitos TCD8⁺ não senescente (CD28⁺) e senescente (CD28^{neg}) é semelhante na comparação intragrupo. A comparação de linfócitos TCD8⁺ não senescente (CD28⁺) e senescente (CD28^{neg}) entre os grupos de idosos também não demonstrou diferença. Na subpopulação CD4⁺, a perda da expressão desta molécula é um evento raro (21). No grupo NT, 60% (9/15) dos idosos apresentaram porcentagem de CD4⁺CD28⁺ superior a 90%. No grupo TM, uma proporção maior de idosos (75%, 12/16) apresentou porcentagem de CD4⁺CD28⁺ superior a 90% ($p=0,04$). Onze dos 15 idosos do grupo NT (73%) apresentaram proporção de CD4⁺CD28^{neg} >4% enquanto que este achado foi observado em apenas seis dos 16 idosos do grupo TM (37.5%, $p=0.07$).

Fig. 13. Distribuição das subpopulações CD28⁺ e CD28^{neg} nos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. A) Análise da distribuição das células CD28⁺ e CD28^{neg} nas subpopulações TCD8⁺ do sangue periférico. NT = idosos não treinados ($n=15$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=16$). B) Análise da distribuição das células CD28⁺ e CD28^{neg} nas subpopulações T CD4⁺ do sangue periférico. Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

6.3 Determinação do comprimento do telômero dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺

Os telômeros encurtam a cada divisão celular, sendo que células que apresentam telômeros muito pequenos perdem a sua capacidade de divisão, tornando-se senescentes. O envelhecimento natural leva ao acúmulo

de linfócitos senescentes, o que a priori comprometeria a atuação do sistema imune, uma vez que, finalizada a parte do reconhecimento antigênico, o próximo passo seria a expansão clonal dos linfócitos ativados para realizarem a parte efetora da resposta imune. Assim, a diminuição da capacidade linfoproliferativa seria mais uma das características da imunossenescência (34,35).

A determinação do comprimento do telômero foi realizada a partir dos linfócitos T totais e suas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e seus subtipos “naive” (TCD4⁺CD45RO^{neg}), de memória (TCD4⁺CD45RO⁺), não senescente (TCD8⁺CD28⁺) e senescente (TCD8⁺CD28^{neg}).

A análise do comprimento do telômero nos linfócitos T totais demonstrou que os idosos TM apresentaram telômero maiores que os idosos NT ($p = 0,03$) [fig. 14]. A análise das subpopulações dos linfócitos T demonstrou que apesar dos linfócitos TCD4⁺ do grupo TM apresentar uma mediana superior à mediana do grupo NT em cerca de 200 pares de bases, não houve diferença estatística na comparação entre os grupos (fig. 15).

A subpopulação de linfócitos TCD8⁺ apresentou equivalência de comprimento do tamanho do telômero na comparação entre os grupos, com mediana de 1,49 Kpb nos idosos NT e de 1,47 Kpb nos idosos TM (fig. 15).

Fig. 14. Determinação do comprimento do telômero nos linfócitos T totais. NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM= idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Fig. 15. Determinação do comprimento do telômero nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

A análise comparativa intragrupo entre os subtipos TCD4⁺ “naive” e de memória, TCD8⁺ não senescente e senescente evidencia que as células com histórico de ativação prévia possuem telômeros significativamente menores nos dois grupos de idosos (Fig. 16 e Fig. 17).

Fig. 16. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ "naive" e de memória. A) Idosos não treinados $n = 14$. B) idosos treinados moderadamente, $n=14$. Paired test.

Fig. 17. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescente e senescente. A) Idosos não treinados, $n = 14$. B) idosos treinados moderadamente, $n=14$. Paired test.

Em relação à comparação entre os grupos, verificou-se que o grupo TM apresentou telômeros discretamente maiores que os NT, em todos os subtipos dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, sem diferença estatisticamente significativa em todas as comparações (Fig. 18).

Fig. 18. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. A) Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ "naive" e de memória. B) Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescente e senescente. Idosos não treinados ($n = 14$), idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

6.4 Funcionalidade dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺

As alterações fenotípicas, como a perda do CD28, e genotípicas, como o encurtamento do telômero, resultam na diminuição da capacidade proliferativa dos linfócitos T em idosos, em especial na subpopulação TCD8⁺. (117).

A resposta linfoproliferativa foi o primeiro parâmetro funcional avaliado. Para isto foi utilizado o mitógeno PHA e um antígeno ubiquitário: lisado viral de citomegalovírus (CMV). Como citado anteriormente, em nosso estudo, 93,7% dos idosos não treinados (14/15) e 87,5% dos idosos treinados moderadamente (14/16) apresentaram sorologia positiva para CMV. A capacidade das células proliferarem espontaneamente e em resposta aos dois estímulos imunológicos utilizados, foi medida pela quantificação da expressão do marcador Ki67, uma proteína intracelular expressa apenas por células em divisão celular.

Com relação à proliferação constitutiva (porcentagem de células em proliferação na ausência de um estímulo exógeno) das subpopulações CD4⁺ e

CD8⁺, observou-se que, conforme o esperado para células do sangue periférico de indivíduos “saúdáveis”, esta porcentagem foi baixa, mas nos idosos NT a porcentagem de linfócitos TCD8⁺CD28⁺Ki67⁺ foi significativamente maior que nos idosos TM ($p=0,003$) (Fig. 20).

Após estimulação com PHA observou-se grande capacidade de resposta proliferativa nos linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ (“memória”), decrescendo nos linfócitos TCD4⁺CD45RO^{neg} (“naive”) de forma similar nos dois grupos de idosos (Fig. 19).

Fig.19. Análise da capacidade linfoproliferativa frente à PHA nos subtipos de linfócitos TCD4⁺naive” (RO^{neg}) e de memória (RO⁺). NT = idosos não treinados ($n=14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

A resposta proliferativa frente ao estímulo com PHA nos linfócitos TCD8⁺CD28⁺, demonstrou que a porcentagem de células Ki67⁺ nos idosos NT é maior que nos idosos TM, estando no limite da significância $p=0.055$. Os

linfócitos TCD8⁺28^{neg} apresentaram os menores índices de proliferação, sendo a porcentagem de células Ki67⁺ equivalente entre os dois grupos (Fig. 20).

Fig. 20: Análise da capacidade linfoproliferativa frente à PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺) e senescentes (CD28^{neg}). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Em relação à resposta linfoproliferativa ao CMV, a maior porcentagem de células Ki67⁺ foi detectada na subpopulação TCD4⁺CD45RO⁺, com uma frequência que variou de 0,25 a 1,4% das células respondendo ao antígeno de CMV, enquanto, uma pequena parcela da resposta ao CMV foi detectada na subpopulação TCD4⁺ CD45RO^{neg} em ambos os grupos. Para as células TCD8⁺, tanto nas senescentes quanto nas não senescentes, a expressão de Ki67 foi praticamente inexistente em ambos os grupos (Fig. 21).

Fig. 21. Análise da capacidade linfoproliferativa frente ao CMV nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ “naive” (CD45RO^{neg})/memória (CD45RO⁺) e TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺)/ senescentes (CD28⁻). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

O segundo parâmetro analisado foi à secreção de citocinas com padrão Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF) e Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), quantificadas em sobrenadante de cultura celular frente ao estímulo mitogênico PHA e antigênico CMV (Fig. 22). Na resposta constitutiva (não estimulada) foi detectada somente a produção da citocina IL-6, com um valor próximo ao limite mínimo de detecção, com mediana de 13,3 pg/mL nos idosos NT e de 16,4 pg/mL nos idosos TM. Em ambos os grupos, o estímulo com PHA levou a produção de citocinas de ambos os padrões, com grande produção de IL-2 seguida por IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10. A exceção foi a citocina IL-4 com uma produção muito próxima do limite mínimo de detecção nos idosos NT (mediana de 3,2 pg/mL) e TM (3,0 pg/mL). A estimulação com CMV ocasionou uma elevada secreção da citocina IL-6, em ambos os grupos. A secreção das demais citocinas, em contrapartida, ou não foi detectada, ou quando houve, foi detectada em níveis muito próximos ao limite mínimo de detecção. A comparação entre grupos não mostrou diferença, tanto em relação à quantidade quanto ao padrão de citocinas secretadas por linfócitos T estimulados (Fig. 22).

Concentrações das Citocinas

	Basal		PHA		CMV	
	NT	TM	NT	TM	NT	TM
IFN- γ	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	1138 (280 – 1138)	2387 (179 – 5647)	12,8 (0 – 42)	1,3 (0 – 38)
TNF	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	7175 (1782 – 12050)	4417 (1946 – 14886)	5,2 (0,9 – 33)	8,3 (3,8 – 29,3)
IL-10	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	744 (602 – 1560)	1292 (710 – 1593)	4,4 (3 – 6,5)	4,8 (1,5 – 8,8)
IL-6	13,3 (3,6 – 68)	16,4 (6 – 36,5)	9293 (6587 – 14553)	9409 (6391 – 15593)	11169 (6340 – 18354)	13203 (6522 – 20712)
IL-4	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	3,2 (0,9 – 4,7)	3,0 (0,7 – 6,5)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)
IL-2	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	18558 (1219 – 73048)	10461 (18,6 – 73048)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)

Fig. 22. Perfil de secreção de citocinas em sobrenadante de cultura em pg/ml. Determinação em três condições: basal (não estimulado), PHA (estímulo mitogênico) e CMV (estímulo antigênico). A) idosos não treinados ($n = 14$). B) idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

O último parâmetro avaliado nas subpopulações celulares ($CD4^+CD45RO^{+/-neg}$ e $CD8^+CD28^{+/-neg}$) foi a apoptose induzida por PHA e a que ocorreu espontaneamente nas células em cultura. Dois marcadores intracelulares foram utilizados: caspase-3, componente essencial na via de sinalização para apoptose, e Bcl-2, que tem papel anti-apoptótico. Em relação a apoptose espontânea, a expressão de caspase-3 foi relativamente baixa nas células mantidas em cultura sem estímulo ($<0,5\%$), em ambos os grupos, como mostram as Figuras 23 e 24. Porém, os idosos do grupo TM apresentaram as menores porcentagens de expressão de caspase-3, sendo esta diferença significativa na comparação entre as subpopulações $CD8^+CD28^{neg}$.

Fig. 23. Análise da apoptose “in vitro”, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos $CD4^+$ “naive” ($CD45RO^{neg}$)/memória ($CD45RO^+$). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Fig. 24. Análise da apoptose “in vitro”, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺)/ senescentes (CD28^{neg}). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Na comparação intragrupo, a expressão de caspase-3 em células “em repouso” foi maior na subpopulação de linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ (de “memória”) do que na subpopulação CD45RO^{neg} (“naive”) no grupo de idosos TM ($p < 0,05$); o mesmo não foi verificado no grupo de idosos NT. Em células estimuladas com PHA os linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ (memória) apresentaram menor expressão de caspase-3 que as CD45RO^{neg} (“naive”), sendo $p < 0,05$ no grupo NT e $p < 0,001$ no grupo TM. A expressão de caspase-3 na comparação entre os subtipos CD8⁺CD28⁺ e CD28^{neg} mostrou que os linfócitos CD8⁺CD28^{neg} apresentaram maior expressão de caspase-3 em relação aos linfócitos CD8⁺CD28⁺ em ambos os grupos ($p < 0,05$).

A comparação entre os grupos demonstrou que a porcentagem de linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ expressando caspase-3 foi similar entre os dois grupos, sendo o mesmo observado nos linfócitos TCD4⁺CD45RO^{neg}. Assim, como nas supopulações de linfócitos TCD4⁺, a porcentagem de linfócitos TCD8⁺CD28⁺ e CD28^{neg} que expressam caspase-3 foi similar entre os dois grupos.

A expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 foi detectada nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ (CD45RO^{+/neg}) e TCD8⁺ (28^{+/neg}), tanto nas células mantidas em cultura sem estímulo, como nas estimuladas com PHA. Em ambas as condições, a proporção de linfócitos “naive” e memória nos linfócitos TCD4⁺ e células senescentes/ não senescentes nos linfócitos TCD8⁺ que expressaram a molécula anti-apoptótica Bcl-2 foi semelhante em ambos os grupos. Em relação à comparação intragrupo, o grupo TM apresentou uma maior porcentagem de linfócitos TCD4⁺CD45RO^{neg}Bcl-2⁺ na condição sem estímulo ($p<0,05$), e maior proporção de linfócitos TCD4⁺CD45RO⁺ Bcl-2⁺ com o estímulo da PHA ($p=0,001$). O mesmo não foi observado no grupo de idosos NT. Após a estimulação com PHA, a porcentagem de linfócitos TCD8⁺CD28⁺ que expressaram a molécula Bcl-2 foi maior que a de linfócitos TCD8⁺CD28^{neg} no grupo de idosos TM ($p< 0,05$), não havendo diferença entre as subpopulações de linfócitos TCD8⁺ no grupo de idosos NT (Figuras 25 e 26).

Fig. 25. Análise da apoptose “in vitro”, expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ “naive” (CD45RO^{neg})/memória (CD45RO⁺). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Fig. 26. Análise da apoptose “in vitro”, expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺)/senescentes (CD28^{neg}). NT = idosos não treinados ($n = 14$), TM = idosos treinados moderadamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

6.5 Inflamm-aging

Em nosso estudo dosamos os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF, IL-1 β , IL-12_{p70} e IFN- γ , da citocina anti-inflamatória IL-10 e da quimiocina IL-8. A Tabela 7 demonstra os valores de dosagem destas citocinas. Em ambos os grupos, nota-se que não houve a detecção da citocina IFN- γ . As citocinas IL1 β , IL-12_{p70} e TNF foram detectadas em níveis que variaram entre concentrações baixíssimas e indetectáveis. A citocina IL-10 foi detectada também em níveis baixos, com concentrações semelhantes entre os dois grupos. Os maiores níveis detectados foram da quimiocina IL-8, seguido pela citocina IL-6, porém, não houve diferença entre as concentrações na comparação entre os grupos.

Tabela 7. Dosagens séricas de citocinas no soro dos idosos por CBA.

	NT <i>n</i> = 15	TM <i>n</i> = 16
IL-10	46,2 (23,5 – 98.8)	55.4 (38.9 – 91.3)
IFN-γ	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)
IL-8	1184 (1046 – 1720)	1648 (967.5 – 3296)
IL- 1β	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 78,8)
IL-12_{p70}	0.0 (0.0 – 23,55)	15.3 (0.0 – 27)
IL-6	245 (95.2 – 441)	282.4 (128 – 439)
TNF	0.0 (0.0 – 68,6)	0.0 (0.0 – 63.8)

Dados em mediana e percentis 25 – 75% (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-12_{p70}: 12.6; IL-6: 68.4; TNF: 67.3.

6.6 Produção de anticorpos anti-Influenza

Com o intuito de verificar se a atividade física aeróbia regular realizada moderadamente tem algum impacto sobre a resposta humoral, realizamos durante a campanha nacional contra a gripe (anti- Influenza), em 2012 e 2013, a coleta do soro dos indivíduos idosos de ambos os grupos, pré-vacinação, seis semanas e 24 semanas pós-vacinação. Assim, avaliamos a cinética de produção e queda dos títulos de anticorpos anti-influenza (H_1N_1 , H_3N_2 e B).

A análise da produção de anticorpos contra o antígeno B mostra que ambos os grupos de idosos apresentavam uma média de anticorpos inferior a 40 (título considerado protetor) no período pré-vacinal. Após seis semanas o grupo de idosos TM mostrou um aumento de título em relação ao tempo zero ($p < 0,0001$), porém, não atingindo o título protetor. O mesmo não foi verificado no grupo de idosos NT que permaneceu com título semelhante ao apresentado na pré-vacinação. Após 24 semanas não houve uma queda significativa nos títulos em ambos os grupos de idosos, os quais permaneceram semelhantes aos títulos obtidos após seis semanas da vacinação. Porém, o título obtido com 24 semanas de vacinação do grupo de idosos TM foi maior que o apresentado no período pré-vacinal ($p < 0,05$), enquanto que, o grupo dos idosos NT apresentou valor de título semelhante ao pré-vacinal (Fig. 27).

As médias geométricas dos títulos de anticorpos anti-B do grupo de idosos TM foram, em todos os períodos, de aproximadamente o dobro das médias geométricas apresentadas pelo o grupo de idosos NT, porém, houve diferença estatística somente entre os títulos de anticorpos após 24 semanas da vacinação ($p < 0,05$).

Fig. 27. Cinética dos títulos de anticorpos anti-*Influenza B*. NT idosos não treinados, $n=15$. TM idosos treinados moderadamente, $n=23$. *** pré-vacinação vs seis semanas pós-vacinação $p < 0,0001$; * pré- vacinação vs vinte e quatro semanas pós-vacinação $p < 0,005$. Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

Em relação à produção de anticorpos anti- H_3N_2 o grupo de idosos TM já apresentava um título protetor no período pré-vacinação, sendo que, o mesmo não ocorreu com o grupo de idosos NT. Após seis semanas de vacinação os títulos de ambos os grupos aumentaram, sendo superiores ao valor protetor. Houve queda nos títulos após 24 semanas de vacinação, porém o grupo de idosos TM manteve um título superior ao valor tido como protetor, enquanto que, o valor apresentado pelo grupo de idosos NT foi inferior ao valor protetor (Fig. 28).

A comparação entre os grupos quanto à produção de anticorpos anti- H_3N_2 mostrou que o grupo de idosos TM apresentou uma maior produção de anticorpos após seis semanas de vacinação do que o grupo de idosos NT ($p < 0,05$). Mesmo com o grupo de idosos TM apresentando média geométrica do

título de anticorpo anti-H₃N₂ duas vezes maior que a média geométrica apresentada pelo grupo de idosos NT após 24 semanas de vacinação, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Fig. 28. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H₃N₂. NT idosos não treinados, $n=15$. TM idosos treinados moderadamente, $n = 23$. * pré-vacinação vs seis semanas pós-vacinação e seis semanas vs 24 semanas pós-vacinação, $p < 0,05$; *** pré-vacinação vs seis semanas pós-vacinação $p < 0,0001$, ** seis semanas vs 24 semanas pós-vacinação $p < 0,001$. Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

A análise da produção de anticorpos anti-H₁N₁ mostrou que os títulos apresentados por ambos os grupos no período pré-vacinação eram menores que o título protetor. Após seis semanas de vacinação verificamos aumento nos títulos de anticorpos em ambos os grupos, mas somente no grupo de idosos TM esse aumento levou a um título protetor. Houve queda nos títulos de anticorpos após 24 semanas da vacinação, porém, o grupo de idosos TM

manteve a média geométrica de título superior ao título protetor, enquanto que o mesmo não foi verificado no grupo de idosos NT (fig. 29).

A comparação entre os grupos mostrou que o grupo de idosos TM apresentou um título de anticorpos maior que o grupo de idosos NT no período pré-vacinação e após 24 semanas da vacinação. Após seis semanas de vacinação a média geométrica do título de anticorpos anti-H₁N₁ do grupo de idosos TM foi 2,5 vezes maior que a média geométrica do título de anticorpos anti-H₁N₁ do grupo de idosos NT, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Fig. 29. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H₁N₁. NT idosos não treinados, $n=15$. TM idosos treinados moderadamente, $n = 23$. *** pré-vacinação vs seis semanas pós-vacinação $p < 0,0001$; * e ** seis semanas pós vacinação vs vinte e quatro semanas pós-vacinação, respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,001$; * pré-vacinação vs vinte e quatro semanas pós vacinação $p < 0,05$. Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

VII- DISCUSSÃO

Imunossenescência é um termo que se refere às alterações na composição, função e competência do sistema imune que ocorrem ou por envelhecimento natural, ou ocasionado por infecções latentes, como por exemplo pelo vírus HIV. O interesse na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunossenescência surgiu com a alteração da pirâmide etária das populações, principalmente em países desenvolvidos. Nestas, está ocorrendo diminuição da população jovem e aumento da população idosa, em consequência do aumento da expectativa de vida que têm ocorrido nos últimos dois séculos, chegando a um aumento de 20 anos somente nas últimas cinco décadas (1). Isto porque com o aumento da idade há aumento da morbidade e mortalidade por infecções no trato respiratório (39), e diminuição na resposta vacinal (51,53). Além de compreender os mecanismos e alterações envolvidos na imunossenescência, também há a necessidade de conhecer formas que possam minimizar qualquer que seja o efeito deletério que o envelhecimento do sistema imune ocasiona. Uma forma estudada, de maneira intervencionista, é a prática de atividade física, cujos dados apresentados até o momento são contraditórios quanto ao benefício sobre o envelhecimento do sistema imune, seja pelo período aplicado na intervenção, seja pelos diferentes protocolos de atividade física aplicada (73- 101). O objetivo de nosso estudo foi o de verificar se a atividade aeróbia praticada de forma moderada e regular levaria a um retardo nas alterações que foram descritas no sistema imune com o aumento da idade.

Um aspecto diferencial de nosso trabalho em relação aos trabalhos descritos na literatura sobre o efeito da atividade física nas alterações que ocorrem no sistema imune adaptativo celular no envelhecimento foi o fato de não ter sido um estudo intervencionista: avaliamos a prática da atividade física como um estilo de vida espontaneamente determinado pelos idosos do estudo.

A seleção dos indivíduos idosos estudados foi realizada a partir de uma avaliação geriátrica ampla, o que permitiu que obtivéssemos dados a respeito do status funcional, função cognitiva, estado emocional,

disponibilidades e adequação de suporte familiar e social, condições ambientais, estado e risco nutricional proporcionando uma análise da qualidade de vida destes idosos. Estes apresentaram uma boa qualidade de vida e uma boa auto percepção de saúde, sendo estes dados corroborados pelos parâmetros laboratoriais que se apresentaram dentro da normalidade, de acordo com os valores de referências, para todas as funções básicas analisadas (hepáticas, renais, endócrinas e metabólicas). Aplicamos este rigor na seleção destes indivíduos para torná-los equiparáveis quanto à questão saúde, uma vez que qualquer diferença neste âmbito poderia criar um viés na análise comparativa da funcionalidade do sistema imune entre os grupos formados. A divisão dos grupos em indivíduos NT e TM foi realizada a princípio pela pontuação em MET's obtida com o questionário IPAQ, e posteriormente confirmada pelo teste ergoespirométrico de Heck modificado, que é utilizado como teste "gold standard" para a medida do limite funcional do sistema cardiorrespiratório em atletas. O VO_{2MAX} mostrou que os idosos TM quando comparados com idosos NT e treinados intensamente (TI) apresentam uma posição média em relação a estes, permitindo assim que estes fossem considerados como treinados moderadamente. Sendo que esta prática era realizada de forma regular e crônica, com tempo médio de prática de atividade física de 15 anos (variando entre cinco a > 30 anos).

A capacidade dos linfócitos T de responder frente ao um estímulo com consequente proliferação e secreção de citocinas é a marca da competência do sistema imune adaptativo celular. A resposta imune adaptativa celular contra patógenos origina-se com uma expansão clonal vigorosa de linfócitos T específicos ao antígeno que foi reconhecido sobre a superfície de células apresentadoras de antígeno, em especial as DCs nos órgãos linfoides secundários. Uma vez que o antígeno é eliminado, linfócitos de memória central (T_{MC}) e memória efetora (T_{ME}) persistem realizando uma vigilância imunológica nos órgãos linfoides e tecidos não linfoides periféricos, permitindo uma resposta mais rápida e potente em um reencontro com o antígeno. Os linfócitos T_{MC} expressam a molécula CCR7, receptor necessário para a migração dos linfócitos T para os órgãos linfoides secundários. Quando comparados aos linfócitos T "naive", os linfócitos T_{MC} apresentam limiar baixo

de ativação a pequenas quantidades de antígenos, respondendo vigorosamente à estimulação antigênica com intensa atividade proliferativa e secreção de IL-2, seguidas de diferenciação eficiente em células efetoras e produção de grandes quantidades de IFN- γ (TH1), IL-4 (TH2), IL-6, IL1- β , TGF- β (TH17) e IL-6 e TNF (TH22). Já os linfócitos T_{ME} perdem a expressão constitutiva do CCR7, apresentando receptores de quimiocinas e moléculas de adesão necessárias à migração para os sítios de inflamação. Quando comparadas aos linfócitos T_{MC} , os linfócitos T_{ME} apresentam uma rápida função efetora, produzindo e secretando citocinas ($TCD4^+$) ou rapidamente se tornando citotóxicas ($TCD8^+$), mas sem significativa atividade proliferativa, necessitando, portanto dos linfócitos T_{MC} para formar um pool suficiente de células para realizar o “clearance” antigênico.

Um dos principais biomarcadores da imunossenescência é a diminuição na proporção e números de linfócitos T periféricos “naive”, especialmente $CD8^+$, com consequente aumento dos linfócitos T de memória (efetora e central) [16-17]. Isto foi evidenciado nos idosos de ambos os grupos de estudo, com a porcentagem de linfócitos $TCD4^+$ de memória sendo superior a 70% e a de linfócitos $TCD8^+$ de memória em torno de 70%. Porém, os idosos NT apresentaram maior porcentagem de linfócitos $TCD4^+$ “naive”, enquanto que os idosos TM apresentaram maior população de linfócitos T_{MC} . O significado fisiológico da maior porcentagem de linfócitos “naive” nos idosos NT não foi evidenciado em nosso estudo, uma vez que estes não apresentaram uma maior resposta linfoproliferativa frente à estimulação inespecífica em relação aos idosos TM. Em contrapartida, a presença de uma maior porcentagem de linfócitos $TCD4^+_{MC}$ apresentada pelos idosos TM pode estar relacionada a um maior título protetor para a vacina anti-Influenza. Estudos em modelos experimentais demonstraram que a subpopulação de linfócitos $TCD4^+_{MC}$ e não a subpopulação $TCD4^+_{ME}$ que foi responsável pela proteção pós-vacinação (118-120). Assim, o significativo aumento (aproximadamente 30%) na porcentagem de linfócitos $TCD4^+_{MC}$ pode ser considerado um efeito positivo da prática de atividade física moderada regular. Esta hipótese foi reforçada por recente estudo de Derhovanessian e cols., 2014^[121], que verificaram que indivíduos idosos (> 65 anos) soropositivos para o CMV

apresentam comprometimento “in vitro” na capacidade dos linfócitos $\text{TCD4}^+_{\text{MC}}$ em secretar citocinas ($\text{IFN-}\gamma$, TNF e IL-2), frente à estimulação com antígenos do vírus influenza quando comparados com indivíduos idosos com a mesma idade soronegativos para CMV. De fato, idosos TM do nosso estudo, em sua grande maioria soropositivos para o CMV, apresentaram não somente aumento na proporção de indivíduos com título protetor para a vacina anti-influenza como títulos de anticorpos anti-influenza maiores que os idosos NT, também soropositivos para o CMV em sua maioria. Desta forma, o aumento de células $\text{TCD4}^+_{\text{MC}}$ provavelmente se traduziu na reconstituição da resposta vacinal em uma população que apresenta em geral respostas vacinais reduzidas, uma vez que, não evidenciamos outra diferença entre os grupos de idosos NT e TM capaz de explicar este dado.

Ainda em relação à frequência das subpopulações de linfócitos T, a inversão na proporção $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$, uma das características do chamado perfil de risco imunológico, e que associada a soro-positividade ao CMV e à expansão da subpopulação de linfócitos T_{EMRA} , se correlacionaria a um aumento da mortalidade em dois anos entre os indivíduos idosos (41,42), não foi verificada em nenhum dos dois grupos. A soropositividade ao CMV em nossos grupos de estudo foi elevada, porém no Brasil a prevalência da infecção pelo CMV é elevada independente da faixa etária (45-48). Os idosos de nosso estudo, diferentemente do descrito na literatura, na qual a porcentagem de linfócitos $\text{TCD8}^+_{\text{EMRA}}$ em idosos saudáveis com idade variando entre 60 e 80 anos chega a 38% (64), não apresentaram uma elevada frequência desta subpopulação, tanto nos linfócitos TCD4^+ como TCD8^+ . Entretanto, a prática de atividade física aeróbia moderada regular parece ter tido uma repercussão positiva no compartimento de linfócitos TCD4^+ , uma vez que os idosos TM apresentaram uma menor população de $\text{TCD4}^+_{\text{EMRA}}$ (medianas de 3,7% nos idosos NT e de 1,2% nos idosos TM). Linfócitos T_{EMRA} possuem “in vitro” uma menor capacidade proliferativa em resposta a estimulação antigênica ou por citocinas e uma elevada suscetibilidade a apoptose, e “in vivo” um baixo “turnover” celular (122).

Por fim, a perda da expressão da molécula CD28 também é uma das alterações do compartimento de linfócitos T associada à

imunosenescência. É decorrente dos vários ciclos de divisões que os linfócitos T sofrem ao longo dos anos frente a diferentes estímulos. Os idosos de ambos os grupos apresentaram perda de expressão desta molécula em cerca de metade de seu repertório de linfócitos TCD8⁺. Cerca de 60% do total de linfócitos TCD8⁺ perdem a expressão desta molécula tanto em populações de idosos de países desenvolvidos como em desenvolvimento (16,17), contrastando com a baixíssima porcentagem de linfócitos TCD4⁺ apresentando negatividade para esta molécula, como descrito anteriormente e revisado na literatura (16, 123). Assim, como também descrito na literatura, os linfócitos TCD8⁺CD28^{neg} apresentaram uma menor capacidade proliferativa, tanto frente à estimulação mitogênica como a antigênica, mas não podemos afirmar se esta menor capacidade linfoproliferativa foi compensada pelo aumento na função citotóxica, uma vez que não dosamos os mediadores desta função, como perforina e granzima. O efeito negativo da associação entre a perda da molécula CD28 e o encurtamento do telômero na capacidade proliferativa foi verificado em nosso estudo, uma vez que, a menor proliferação frente aos dois estímulos utilizados ocorreu somente na população CD8⁺CD28⁻, pois apesar dos linfócitos TCD4⁺ de memória terem apresentado um comprimento de telômero menor que os linfócitos TCD4⁺ “naive”, estes demonstraram vigorosa resposta proliferativa nos dois grupos de estudo. Em contrapartida, os linfócitos TCD8⁺CD28⁺ apresentaram sua capacidade proliferativa íntegra, sendo que nos idosos NT estes pareciam já estarem previamente ativados, uma vez que apresentaram proliferação espontânea superior ao grupo de idosos TM. Apesar dos idosos TM terem apresentado linfócitos T totais com telômeros mais compridos do que os idosos NT, e com uma tendência a telômeros maiores nas subpopulações dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, esse aparente efeito positivo da prática de atividade física não refletiu “in vitro” um significado biológico, uma vez que as subpopulações dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ proliferaram com a mesma intensidade dos linfócitos dos idosos NT, frente a ambos os estímulos. Curiosamente, frente ao estímulo com um antígeno viral, os linfócitos T com maior proliferação não foram os linfócitos TCD8⁺CD28^{+/-neg}, e sim os linfócitos TCD4⁺ de memória, isto porque, a resposta efetora contra antígenos virais é predominantemente efetuada por linfócitos TCD8⁺ citotóxicos.

O padrão de citocinas produzidas pelos linfócitos T frente à estimulação mitogênica e antigênica foi preferencialmente Th1 em ambos os grupos de estudo. A citocina pró-inflamatória IL-6 têm sua concentração plasmática aumentada com a idade, estando associada ao background inflamatório conhecido como “Inflamm-aging”, fenômeno implicado na patogênese de doenças relacionadas ao aumento da idade, como doenças cardíacas, diabetes mellitus e demência. A elevação desta citocina é considerada um indicador do aumento da morbidade e mortalidade em idosos (62). Além disso, linfócitos T de idosos produzem níveis mais elevados destas citocinas que linfócitos de indivíduos jovens, quando estimulados por PHA (124). Este fenômeno foi verificado parcialmente em nosso estudo, uma vez que, a produção desta citocina foi elevada em resposta a estimulação mitogênica e antigênica, porém a sua concentração plasmática foi muito baixa em ambos os grupos de idosos. O único achado em relação às citocinas pró-inflamatórias no soro dos idosos foi à presença de níveis um pouco mais elevados da IL-8, porém a concentração encontrada foi em torno de um picograma. A aplicação de uma análise multivariada para determinar a relação entre marcadores de inflamação, idade, doenças crônicas e mortalidade, foi realizada em idosos ($67,7 \pm 16$ anos) e demonstrou que mais do que a presença de marcadores representantes de uma condição pró-inflamatória com o aumento da idade, o que existe é um balanço entre os marcadores pró e anti-inflamatórios, ou seja, idosos que produzem mais marcadores pró-inflamatórios também apresentaram uma maior produção de marcadores anti-inflamatórios, indicando um sistema inflamatório mais ativado, mas não necessariamente mais inflamado (125). Assim, o “Inflamm-aging” seria mais do que um aumento dos marcadores inflamatórios, e sim um balanço entre estes.

A eficácia clínica da vacinação anti-influenza é variável, sendo de 70 a 90% em indivíduos adultos jovens, caindo para 17 a 53% em idosos (51). Observamos em nosso estudo uma maior resposta vacinal nos idosos TM para os antígenos vacinais empregados seis semanas pós-imunização (especialmente H_1N_1 e H_3N_2). Interessante notar que aos seis meses os idosos TM persistiram com títulos elevados e protetores. Esta maior persistência dos anticorpos provavelmente explica a observação de maiores títulos de

anticorpos pré-imunização neste grupo (dia 0). Dados da literatura já apontam para o exercício físico como um fator capaz de aumentar a resposta vacinal (91,92). Nossos achados mostram que este aumento persiste por pelo menos seis meses. O mecanismo proposto é que o estresse físico ao provocar uma resposta inflamatória local (músculo), aumenta a eficiência da apresentação antigênica de imunizações realizadas por via intramuscular (126). Outro mecanismo adicional pode ser o fato dos linfócitos T periféricos dos idosos NT apresentarem maior tendência a entrarem em apoptose, diminuindo o número de linfócitos T capazes de responderem a estimulação, que associado a menor frequência de linfócitos de memória resultaria em uma resposta vacinal diminuída.

Não evidenciamos em nosso grupo de idosos NT todas as alterações descritas no envelhecimento do sistema imune. Talvez, este fato tenha contribuído para não termos verificado um elevado impacto da atividade física aeróbia moderada praticada de forma regular no retardo da imunossenescência.

VIII- CONCLUSÃO

Os dados deste estudo nos permitem concluir que a prática da atividade física moderada regular como estilo de vida contribuiu para a atenuação de alguns aspectos característicos da imunossenescência, uma vez que os idosos treinados moderadamente apresentaram:

- maior frequência de linfócitos T_{MC} e menor frequência de linfócitos T_{EMRA};
- maior capacidade de resposta linfoproliferativa dos linfócitos T CD8⁺ estimulados com mitógeno;
- menor expressão de marcador de apoptose na subpopulação de linfócitos T CD8⁺ CD28^{neg.};
- produção de maiores títulos de anticorpos anti-influenza séricos antes e pós-vacinação.

Entretanto, alguns componentes não foram modificados pela atividade física moderada, pois idosos treinados moderadamente e não treinados apresentaram:

- mesmo perfil de produção de citocinas imunorregulatórias (IL-2, IL-10, TNF e INF- γ) de subpopulações de linfócitos T estimulados com antígenos e mitógenos;
- mesmo nível sérico de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8, IL-10) e ausência das citocinas IL-1b, TNF e IL-12p70;
- comprimento do telômero comparável nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ (memória) e T CD4⁺CD45RO^{neg} ("naive") e subpopulações de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28^{neg.};
- mesma expressão da molécula anti-apoptótica nos linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ (memória) e T CD4⁺CD45RO^{neg} ("naive") e subpopulações de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ e T CD8⁺CD28^{neg.}

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*. 2009; 3; 374(9696):1196-1208.
2. United Nations: world prospects 2012. Available from: <http://esa.un.org/wpp>. Acesso em: 05/03/2015.
3. Expectativa de vida. Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2013>. Acesso em: 17/02/2015.
4. Confort, A. The biology of senescence. 3ed. Nova Iorque: Elsevier, 1979, pp. 27-42.
5. Souza RR, Gorzoni ML, Filho WB. Peculiaridades anatomofuncionais do idoso. Em: Geriatria e Gerontologia: o que todos devem saber. Filho WJ, Gorzoni ML – São Paulo: Roca, 2008. 7-17
6. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 2005; 120(4): 513-522.
7. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*. 1998; 78(2):547-581.
8. Griffiths AFF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. Introdução à Genética. 9. L. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
9. Jardim LB, Ashton-Prolla P, Maluf WS. Prêmio Nobel De Fisiologia e Medicina 2009: O Papel dos Telômeros e da Telomerase na manutenção dos cromossomos. *Rev HCPA* 2009; 29: 271-275.
10. Zijlmans JM, Martens UM, Poon SSS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, Lansdorp PM. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:7423-7428.
11. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia Celular e Molecular*. 4. L. Rio de Janeiro: Editora Revinter Ltda, 2002.

- 12.Kosciolek BA, Rowley PT. Human lymphocyte telomerase is genetically regulated. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 21:124-130.
13. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr Soc*. 2003; 51:116-122
- 14.Beltrão K, Teixeira MP, Parayba MICA. Capacidade funcional dos idosos: uma análise dos suplementos saúde da PNAD com a teoria de resposta ao item. Rio de janeiro: IBGE, Diretoria de Pesquisas, 2013. 132 p.
- 15.Brasil, Ministério da saúde. Rede interagencial de informações para a saúde. Indicadores de Mortalidade. C.4 Mortalidade proporcional por grupos de causas. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2011/c04.def>. Acesso em: 24/02/2015.
- 16.Arnold CR, Wolf J, Brunner S, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstein B. Gain and loss of T cell subsets in old age: age-related reshaping of the T cell repertoire. *J Clin Immunol*. 2011; 31(2): 137-146.
- 17.Alam I, Goldeck D, Larbi A, Pawelec G. Aging affects the proportions of T and B cells in a group of elderly men in a developing country-a pilot study from Pakistan. *Age (Dordr)*. 2013; 35(5):1521-1530.
- 18.Targonski PV, Jacobson RM, Poland GA. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine*. 2007; 25(16):3066-3069.
- 19.Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett*. 2006; 236(1):13-23.
- 20.Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007; 447(7145):725-729.
- 21.Ju Z, Jiang H, Jaworski M, Rathinam C, Rathinam C, Gompf A, Klein C, Trumpp A, Rudolph KL. Telomere dysfunction induces environmental alterations limiting hematopoietic stem cell function and engraftment. *NatMed*. 2007; 13(6):742-747.

22. Wagner W, Horn P, Bork S, Krunic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber FX, Eckstein V, Boukamp P, Ho AD. Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche .*Exp Gerontol*. 2008; 43(11):974-980.
23. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol*. 1986; 75:43-88.
24. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? *Immunol Today*. 1996; 17(6): 267-272.
25. Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol*. 2000; 20(4): 250-256.
26. Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, Casti A, Franceschi C, Passeri M, Sansoni P. Shortage of circulating naïve CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*. 2000; 95(9):2860-2868.
27. Lazuardi L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grubeck-Loebenstien B. Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology*. 2005; 114(1):37-43.
28. Gupta S, Gollapudi S. TNF-alpha-induced apoptosis in human naïve and memory CD8+ T cells in aged humans. *Exp Gerontol*. 2006; 41(1):69-77.
29. Gupta S, Gollapudi S. CD95-mediated apoptosis in naïve, central and effector memory subsets of CD4+ and CD8+ T cells in aged humans. *Exp Gerontol*. 2008; 43(4): 266-274.
30. Ahmed M, Lanzer KG, Yager EJ, Adams PS, Johnson LL, Blackman MA. Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naïve CD8 T cell repertoire of aged mice. *J Immunol*. 2009; 182(2):784-792.
31. Haynes L, Eaton SM. The effect of age on the cognate function of CD4+ T cells. *Immunol Rev*. 2005; 205:220-228.
32. Linton PJ, Haynes L, Klinman NR, Swain SL. Antigen-independent changes in naïve CD4 T cells with aging. *J Exp Med*. 1996; 184(5):1891-1900.

33. Garcia GG, Miller RA. Age-dependent defects in TCR-triggered cytoskeletal rearrangement in CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 2002; 169(9):5021-5027.
34. Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H, Gregersen PK. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8⁺ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28⁺CD8⁺ counterparts. *J Immunol.* 1996; 156(10): 3587-3590.
35. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naïve and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:11091- 11094.
36. Parish ST, Wu JE, Effros RB. Sustained CD28 expression delays multiple features of replicative senescence in human CD8⁺ T lymphocytes. *J Clin Immunol.* 2010; 30(6):798-805.
37. Spaulding C, Guo W, Effros RB. Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol.* 1999; 34(5):633-644.
38. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281(5381): 1312-1316.
39. Wick G, Jansen-Dürr P, Berger P, Blasko I, Grubeck-Loebenstien B. Diseases of aging. *Vaccine.* 2000; 18(16): 1567-1583.
40. Ferguson FG, Wikby A, Maxson P, Olsson J, Johansson B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995; 50(6):B378-382.
41. Strindhall J, Skog M, Ernerudh J, Bengner M, Löfgren S, Matussek A, Nilsson BO, Wikby A. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr).* 2013 Jun; 35(3):985-991.
42. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, Schönitzer D, Grubeck-Loebenstien B. Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8⁺ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in

- the cytokine production profile in elderly persons. *J Virol.* 2005; 79(6):3675-3683.
43. Ouyang Q, Wagner WM, Zheng W, Wikby A, Remarque EJ, Pawelec G. Dysfunctional CMV-specific CD8 (+) T cells accumulate in the elderly. *Exp Gerontol.* 2004; 39(4):607-613.
 44. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005; 202(5): 673-685.
 45. Suassuna JH, Leite LL, Villela LH. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28(2): 105-108.
 46. Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010; 32(1): 45-49.
 47. Almeida LN, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 2001; 35(2):124-129.
 48. do Amaral RP, de Saidneuy AE, Ribeiro WL, de Andrade J. Serological profile of potential solid organ donors in Santa Catarina, Brazil. *Transplant Proc* 2008; 40(3):665-667.
 49. Kolibab K, Smithson SL, Rabquer B, Khuder S, Westerink MA. Immune response to pneumococcal polysaccharides 4 and 14 in elderly and young adults: analysis of the variable heavy chain repertoire. *Infect Immun.* 2005; 73(11):7465-7476.
 50. Eaton SM, Burns EM, Kusser K, Randall TD, Haynes L. Age-related defects in CD4 T cell cognate helper function lead to reductions in humoral responses. *J Exp Med.* 2004; 200(12):1613-1622.
 51. Sasaki S, Sullivan M, Narvaez CF, Holmes TH, Furman D, Zheng NY, Nishtala M, Wrammert J, Smith K, James JA, Dekker CL, Davis MM, Wilson PC, Greenberg HB, He XS. Limited efficacy of inactivated influenza vaccine in elderly individuals is associated with decreased

- production of vaccine-specific antibodies. *J Clin Invest.* 2011; 121(8):3109-3119.
52. Schenkein JG, Park S, Nahm MH. Pneumococcal vaccination in older adults induces antibodies with low opsonic capacity and reduced antibody potency. *Vaccine.* 2008; 26(43):5521-5526.
 53. Remarque EJ, de Bruijn IA, Boersma WJ, Masurel N, Ligthart GJ. Altered antibody response to influenza H1N1 vaccine in healthy elderly people as determined by HI, ELISA, and neutralization assay. *J Med Virol.* 1998; 55(1):82-87.
 54. Butcher SK, Chahal H, Nayak L, Sinclair A, Henriquez NV, Sapey E, O'Mahony D, Lord JM. Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *J Leukoc Biol.* 2001; 70(6):881-886.
 55. Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guérard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell.* 2004; 3(4):217-226.
 56. Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17(5):457- 462.
 57. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Malavolta M. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol.* 2009; 29(4):416-425.
 58. Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, Yung RL. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor immunity. *Cancer Res.* 2008; 68:6341–6349.
 59. Jing Y, Shaheen E, Drake RR, Chen N, Gravenstein S, Deng Y. Aging is associated with a numerical and functional decline in plasmacytoid dendritic cells, whereas myeloid dendritic cells are relatively unaltered in human peripheral blood. *Hum Immunol.* 2009; 70:777–784.
 60. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, Chen S, Towle V, Belshe RB, Fikrig E, Allore HG, Montgomery RR, Shaw AC. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol.* 2010; 184:2518–2527.

61. Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* 2007; 178:6912–6922.
62. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 908:244-254.
63. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.* 2010; 74(2):213-220.
64. Grivennikov SI, Karin M. Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Ann Rheum Dis.* 2011; 70 Suppl 1:i104-108.
65. Lencel P, Magne D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses.* 2011; 76(3):317-321.
66. Morales I, Farias G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:202–204.
67. Shepard RJ, Shek PN. Impact of physical activity and sport on the immune system. *Rev Environ Health.* 1996; 11(3): 133-147.
68. Nieman DC. Exercise immunology: practical applications. *Int J Sports Med.* 1997; 18: Suppl 1, S91-100.
69. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL. The effects of acute and chronic exercise of immunoglobulins. *Sports Med.* 1991; 11(3): 183-201.
70. Pedersen BK, Ullum H. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc.* 1994; 26(2): 140-146.
71. Rosa LF, Vaisberg, MW. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8 (4): 167- 172.
72. Nieman, DC. Marathon Training and Immune Function. *Sports Med.* 2007; 37(4-5): 412-415.

73. Shinkai S, Kohno H, Kimura K, Komura T, Asai H, Inai R, Oka K, Kurokawa Y, Shephard R. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc.* 1995; 27(11):1516-1526.
74. 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):951-956.
75. Drela N, Kozdron E, Szczypiorski P. Moderate exercise may attenuate some aspects of immunosenescence. *BMC Geriatrics.* 2004; 4:8.
76. Gueldner SH, Poon LW, La via M, Virella G, Michel Y, Bramlett MH, Noble CA, Paulling E. Long-term exercise patterns and immune function in healthy older women. A report of preliminary findings. *Mech Ageing Dev.* 1997; 93(1-3):215-222.
77. Okutsu M, Yoshida Y, Zhang X, Tamagawa A, Ohkubo T, Tsuji I, Nagatomi R. Exercise training enhances in vivo tuberculosis purified protein derivative response in the elderly. *J Appl Physiol.* 2008; 104(6):1690-1696.
78. Shimizu K, Kimura F, Akimoto T, Akama T, Tanabe K, Nishijima T, Kuno S, Kono I. Effect of moderate exercise training on T-helper cell subpopulations in elderly people. *Exerc Immunol Rev.* 2008; 14: 24-37.
79. Yan H, Kuroiwa A, Tanaka H, Shindo M, Kiyonaga A, Nagayama A. Effect of moderate exercise on immune senescence in men. *Eur J Appl Physiol.* 2001; 86(2):105-111.
80. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol.* 2008; 84(5): 1271-1278.
81. Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, McFarlin BK, Timmerman KL, Coen PM, Felker J, Talbert E. Influence of exercise training and age on CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain Behav Immun.* 2005; 19(5):389-397.
82. Colbert LH, Visser M, Simonsick EM, Tracy RP, Newman AB, Kritchevsky SB, Pahor M, Taaffe DR, Brach J, Rubin S, Harris TB. Physical activity, exercise, and inflammatory markers in older adults:

- findings from the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc.* 2004; 52(7): 1098-1104.
83. Geffken DF, Cushman M, Burke GL, Polak JF, Sakkinen PA, Tracy RP. Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am J Epidemiol.* 2001; 153(3): 242-250.
 84. Nicklas BJ, Hsu FC, Brinkley TJ, Church T, Goodpaster BH, Kritchevsky SB, Pahor M. Exercise training and plasma C-reactive protein and interleukin-6 in elderly people. *J Am Geriatr Soc.* 2008; 56(11): 2045-2052.
 85. de Gonzalo-Calvo D, Fernández-García B, de Luxán-Delgado B, Rodríguez-González S, García-Macia M, Suárez FM, Solano JJ, Rodríguez-Colunga MJ, Coto-Montes A. Long-term training induces a healthy inflammatory and endocrine emergent biomarker profile in elderly men. *Age (Dordr).* 2012; 34(3):761-771.
 86. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJ, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun.* 2011; 25(8): 1521-1529.
 87. Huggett DL, Connelly DM, Overend TJ. Maximal aerobic capacity testing of older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005; 60(1):57-66.
 88. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(24):11091-11094.
 89. Ludlow AT, Zimmerman JB, Witkowski S, Hearn JW, Hatfield BD, Roth SM. Relationship between physical activity level, telomere length, and telomerase activity. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40(10): 1764-1771.
 90. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, Büchner N, Meyer T, Kindermann W, Haendeler J, Böhm M, Laufs U. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation.* 2009; 120(24): 2438-2447.
 91. Kohut ML, Arntson BA, Lee W, Rozeboom K, Yoon KJ, Cunnick JE, McElhaney J. Moderate exercise improves antibody response to influenza immunization in older adults. *Vaccine.* 2004; 22(17-18): 2298-2306.

92. Kohut ML, Cooper MM, Nickolaus MS, Russell DR, Cunnick JE. Exercise and psychosocial factors modulate immunity to influenza vaccine in elderly individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002; 57(9): M557-562.
93. Woods JA, Keylock KT, Lowder T, Vieira VJ, Zelkovich W, Dumich S, Colantuano K, Lyons K, Leifheit K, Cook M, Chapman-Novakofski K, McAuley E. Cardiovascular exercise training extends influenza vaccine seroprotection in sedentary older adults: the immune function intervention trial. *J Am Geriatr Soc.* 2009; 57(12): 2183-2191.
94. Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, Warren BJ, Dotson RC, Butterworth DE, Nehlsen-Cannarella SL. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc.* 1993; 25(7): 823-831.
95. Woods JA, Ccedia MA, Wolters BW, Evans JK, Lu Q, McAuley E. Effects of 6 months of moderate aerobic exercise training on immune function in the elderly. *Mech Ageing Dev.* 1999; 109(1): 1-19.
96. Campbell PT, Wener MH, Sorensen B, Wood B, Chen-Levy Z, Potter JD, McTiernan A, Ulrich CM. Effect of exercise on in vitro immune function: a 12-month randomized, controlled trial among postmenopausal women. *J Appl Physiol.* 2008; 104(6): 1648-1655.
97. Berman S, Philip P, Ferrari P, Candito M, Dolisi C. Effects of a short-term strength training programme on lymphocyte subsets at rest in elderly humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999; 79(4):336-340.
98. Bobeuf F, Labonté M, Khalil A, Dionne IJ. Effect of resistance training on hematological blood markers in older men and women: a pilot study. *Curr Gerontol Geriatr Res.* 2009; 15: 1-4.
99. Rall LC, Roubenoff R, Cannon JG, Abad LW, Dinarello CA, Meydani SN. Effects of progressive resistance training on immune response in aging and chronic inflammation. *Med Sci Sports Exerc.* 1996; 28(11):1356-1365.
100. Raso V, Benard G, DA Silva Duarte AJ, Natale VM. Effect of resistance training on immunological parameters of healthy elderly women. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(12): 2152-2159.

101. Vellas B, Guigoz Y, Garry PJ, Nourhashemi F, Nourhashemi F, Bennahum D, Lauque S, Albaredo JL. The Mini Nutritional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. *Nutrition* 1999;15:116-122
102. Mungas D. In-office mental status testing: a practical guide. *Geriatrics* 1991; 46(7): 54-58.
103. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Brazilian-Portuguese version of the SF-36. A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol* 1999; 39(3): 147-150.
104. Soares A, Govender L, Hughes J, Mavakla W, de Kock M, Barnard C, Pienaar B, Janse van Rensburg E, Jacobs G, Khomba G, Stone L, Abel B, Scriba TJ, Hanekom WA. Novel application of Ki67 to quantify antigen-specific in vitro lymphoproliferation. 2010. *J Immunol Methods*. 2010. 31; 362(1-2):43-50.
105. 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): 1039-1050.
106. 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: 103-109.
107. Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM. 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; 190:157-167.
108. Baerlocher GM, Roth A, Lansdorp PM. Telomeres in hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci*. 2003: 996:44-48.

109. Goodeve A, Potter CW, Clark A Jennings R, Schild GC, Yetts R. A graded dose study of inactivated surface antigen influenza B vaccine in volunteers. *J Hyg Camb.* 1983; 90:107-115
110. ACSM – American College of Sports Medicine. Clinical conditions influencing exercise prescription In: ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. 6th. New York: Lippincott, 2000.
111. Hallal PC, Gomez LF, Parra DC, Lobelo F, Mosquera J, Florindo AA, Reis RS, Pratt M, Sarmiento OL. Lessons learned after 10 years of IPAQ use in Brazil and Colombia. *J Phys Act Health.* 2010; 7 Suppl 2:S259-264.
112. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc.* 1982; 14 (5): 377-381.
113. Eston RG, Faulkner JA, Mason EA, Parfitt G. The validity of predicting maximal oxygen uptake from perceptually regulated graded exercise tests of different durations. *Eur J Appl Physiol.* 2006; 97(5): 535 –541.
114. Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 37:153-156.
115. Beerman, D. Bhattacharya, S. Zandi, M. Sigvardsson, I.L. Weissman, D. Bryder, D.J. Rossi. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:5465–5470.
116. Santagostino A, Garbaccio G, Pistorio A, Bolis V, Camisasca G, Pagliaro P, Girotto M. An Italian national multicenter study for the definition of reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica.* 1999 ;84(6):499-504.
117. Posnett DN, Edinger JW, Manavalan JS, Irwin C, Marodon G. Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones. *Int Immunol.* 1999; 11(2): 229-241.
118. Vogelzang A, Perdomo C, Zedler U, Kuhlmann S, Hurwitz R, Gengenbacher M, Kaufmann SH. Central memory CD4+ T cells are responsible for the recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* Δ ureC::hly

- vaccine's superior protection against tuberculosis. *J Infect Dis.* 2014; 210(12): 1928-1937.
119. Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA, Rosenkrands I, Andersen P. et al. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol.* 2009; 182:8047–8055.
 120. Lindestam Arlehamn CS, Gerasimova A, Mele F, Mele F, Henderson R, Swann J, Greenbaum JA, Kim Y, Sidney J, James EA, Taplitz R, McKinney DM, Kwok WW, Grey H, Sallusto F, Peters B, Sette A. Memory T cells in latent *Mycobacterium tuberculosis* infection are directed against three antigenic islands and largely contained in a CXCR3+CCR6+ Th1 subset. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003130.
 121. Derhovanessian E, Maier AB, Hähnel K, McElhaney JE, Slagboom EP, Pawelec G. Latent infection with cytomegalovirus is associated with poor memory CD4 responses to influenza A core proteins in the elderly. *J Immunol.* 2014 ; 193(7): 3624-3631.
 122. 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): 4260-4266.
 123. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint JP, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4 (+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8 (+) compartment. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127(3): 274-281.
 124. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 1993;23(9):2375-2378.
 125. Morrisette-Thomas V, Cohen AA, Fülöp T, Riesco É, Legault V, Li Q, Milot E, Dusseault-Bélanger F, Ferrucci L. Inflamm-aging does not simply reflect increases in pro-inflammatory markers. *Mech Ageing Dev.* 2014; 139:49-57.

126. Campbell JP, Edwards KM, Ring C, Drayson MT, Bosch JA, Inskip A, Long JE, Pulsford D, Burns VE. The effects of vaccine timing on the efficacy of an acute eccentric exercise intervention on the immune response to an influenza vaccine in young adults. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(2):236-242.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0805/11

Título: IMPACTO DA PRÁTICA DA ATIVIDADE FÍSICA MODERADA REGULAR NO RETARDO DA IMUNOSSENESCÊNCIA DE IDOSOS

Pesquisador Responsável: Gil Benard

Pesquisador Executante: Léia Cristina Rodrigues da Silva

Co-autores: Luiz Garcez Leme, Manuella Toledo, Adriana Ladeira de Araújo, Alberto José da Silva Duarte

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: PATOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 23/11/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 24 de Novembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Elderly men with moderate and intense training lifestyle present sustained higher antibody responses to influenza vaccine

Adriana Ladeira de Araújo · Léia Cristina Rodrigues Silva · Juliana Ruiz Fernandes ·
Manuella de Sousa Toledo Matias · Lucy Santos Vilas Boas · Clarisse Martins Machado ·
Luiz Eugênio Garcez Leme · Gil Benard

Received: 16 June 2015 / Accepted: 7 October 2015
© American Aging Association 2015

Abstract We aimed to verify whether different levels of training performed regularly and voluntarily for many years could have an impact on one of the main issues of immunosenescence: the poor response to vaccines. We recruited 64 healthy elderly men (65–85 years old), 23 with a moderate training (MT) lifestyle (for 17.0 ± 3.2 years), 22 with an intense training (IT) lifestyle (for 25.9 ± 3.4 years), and 16 without a training lifestyle (NT). Fitness was evaluated through the IPAQ and VO_2 max consumption. The participants were evaluated regarding cognitive aspects, nutritional status,

depression, and quality of life. Antibody titers were determined by hemagglutination inhibition assay prior to influenza vaccination and at 6 weeks and 6 months post-vaccination. Strains used were B, H3N2, and H1N1. Our groups were matched for most characteristics, except for those directly influenced by their lifestyles, such as BMI, VO_2 max, and MET. In general, MT and IT elderly men showed significantly higher antibody titers to the three vaccine strains post-vaccination than NT elderly men. There were also higher titers against B and H1N1 strains in the trained groups before vaccination. Additionally, there was a trend for higher proportions of seroprotected (titers $\geq 1:40$) individuals in the exercise groups; the difference was significant for the H1N1 and B strains (MT) and for the H3N2 strain (IT). Of note, there were no significant differences between the MT and IT groups. Either a moderate or an intense training is associated with stronger and longstanding antibody responses to the influenza vaccine, resulting in higher percentages of seroprotected individuals.

Adriana Ladeira de Araújo and Léia Cristina Rodrigues Silva contributed equally to this work.

A. L. de Araújo · L. C. R. Silva · J. R. Fernandes ·
G. Benard (✉)
Laboratory of Dermatology and Immunodeficiencies,
Dermatology Division, Clinics Hospital, São Paulo, Brazil
e-mail: mahong@usp.br

M. de Sousa Toledo Matias · L. E. G. Leme
Department of Orthopedics and Traumatology, School of
Medicine, USP-São Paulo, SP, Brazil

L. S. V. Boas · C. M. Machado
Virology Laboratory, Institute of Tropical Medicine, University of
São Paulo, São Paulo, Brazil

G. Benard
Medical Mycology Laboratory, Institute of Tropical Medicine,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

G. Benard
R. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, Cerqueira Cesar, São
Paulo CEP 05403-903, Brazil

Keywords Vaccine · Influenza · Antibody response ·
Exercise · Lifestyle

Introduction

Immunosenescence refers to changes that affect the competence of the immune system with advancing age. Its etiology is multifactorial and reflects exposure

to external pathogens, persistent viral infections, obesity, physical and psychological stress, and thymic involution among other events over an individual's life (de Araújo et al. 2013). Immunosenescence is a major cause of increased morbidity and early mortality (Larbi et al. 2008) and is characterized by changes in T cell subpopulations, reduced numbers of B cells, deficiencies in antibody isotype switching, and reduced ability to produce specific antibodies (Alam et al. 2013; Agarwal and Busse 2010), all of which compromise immunization responsiveness (Weiskopf et al. 2009). Because of this compromise, influenza remains a significant cause of mortality among the elderly. Recently, regular physical activity has been proposed as a low-cost and potentially effective strategy to retard or prevent immunosenescence (Senchina and Kohut 2007).

Several studies have suggested that regular exercise has a positive impact on the antibody response to the influenza vaccine in older adults (Grant et al. 2008; Keylock et al. 2007; Kohut et al. 2002, 2004; Schuler et al. 2003; Woods et al. 2009; Yang et al. 2007). However, the regular exercise protocols varied among the studies, from aerobic cardiovascular exercises to Tai-chi practices, thus, making it difficult to establish which protocols were optimal (Pascoe et al. 2014). It was concluded from these studies that the necessary volume and relative advantages of endurance and/or resistance training have not been adequately investigated. Moreover, most studies were supervised, 4 to 10 months interventional studies (Grant et al. 2008; Kohut et al. 2004; Woods et al. 2009; Yang et al. 2007). Only three studies enrolled "spontaneously" high- and low-fitness participants. The criteria used to define and measure fitness were also variable and included a self-reported assessment of physical activity recorded through phone interview (Kohut et al. 2002; Schuler et al. 2003) or VO_2max consumption testing (Keylock et al. 2007).

We thus aimed to verify whether different levels of exercise performed regularly and voluntarily for many years could have an impact on one of the main issues of immunosenescence: the poor response to vaccines.

Methods

Participants

This was a cross-sectional study involving 61 healthy elderly men (65–85 years). They were

recruited mainly at runners' associations, sports clubs, community-based exercise programs for elderly, outpatient services, and the association of ex-functionaries of our institution. Exclusion criteria were the presence of co-morbidities that could interfere with the immune system (e.g., AIDS, cancer, rheumatoid arthritis, and uncontrolled diabetes mellitus), use of immunosuppressive drugs (e.g., corticosteroids), smoking habits, alcohol abuse, and lack of influenza vaccination in previous years. Participants underwent clinical evaluation by a physician (MT or LLG) and answered the following questionnaires: global depression score (Yesavage et al. 1982), Mini Nutritional Assessment (Vellas et al. 1999), mini-mental state examination [MMSE] (Brucki et al. 2003), and quality of life SF-36 (Ciconelli et al. 1999). There were 17 participants who had never trained (NT), 25 who moderately trained (MT), i.e., who practiced two or three times/week volleyball, basketball, or running (less than 6 km/training), and 22 who intensely trained (IT), who trained ≥ 5 days/week (>50 km/week). The trained elderly were recruited among those who underwent regular training over at least the last 5 years. The study was approved by the Hospital das Clínicas Review Board (#0135/11), and all participants signed an informed consent form. Blood sampling in the trained groups was conducted ≥ 48 h after the last training session and at least 1 week after participation in any competition. Fitness status was assessed through the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) and a treadmill VO_2 max consumption. The latter was done as previously described with modifications (Santos-Silva et al. 2007). Briefly, during the cardiopulmonary exercise testing, the individuals were monitored with a computerized electrocardiograph (HeartWare Instruments, Ergo 13, BH, Brazil), and heart rate (HR) was measured on the ECG recording (leads DI, DII, DIII, AVf, AVI, AVr, V1, V2, V3, V4, V5, V6) in rest, during exercise and recuperation phase at the end of each minute. The oxygen consumption (VO_2), carbon dioxide output (VCO_2), and minute ventilation (VE) were measured and analyzed by using a metabolic analyzer (CPX/D, MedGraphics, USA) (Milani et al. 2004). The exercise testing was performed in treadmill (hp/Pulsar, Cosmos, Germany). A modified version of the Heck stress test protocol was used (Heck et al. 1985).

148 Influenza vaccination procedure and hemagglutination 149 inhibition assay (HIA)

150 The influenza vaccine is provided freely to individuals
151 over 60 every year by mid April, before the winter season
152 in Brazil. In the years of 2012 and 2013, the vaccine was
153 from Sanofi Pasteur (Vaxigrip, Sanofi Pasteur SA, Val-
154 de-Reuil, France). It is administered intramuscularly at a
155 single dose. The participants were asked to refrain from
156 training in the 48 h previous to the vaccination. The
157 influenza virus antigens used in the vaccine and for the
158 HIA were A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus,
159 A/Perth/16/2009 (H3N2)-like virus, and B/Brisbane/60/
160 2008-like virus (lineage Victoria) for those vaccinated in
161 2012 and A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus,
162 A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus, B/Wisconsin/1/
163 2010-like virus (lineage Yamagata) for those vaccinated
164 in 2013. The HIA was performed according to WHO
165 recommendations (Kendal et al. 1982). Viral concentra-
166 tions were determined by hemagglutinin antigen titration,
167 and the test was performed after removing naturally
168 occurring, non-specific inhibitors from the sera, as de-
169 scribed previously (Kendal et al. 1982). Titration of
170 antigen, serum treatment, and the preparation of chicken
171 erythrocytes were carried out as recommended by the
172 WHO (Webster et al. 2002).

173 Statistical analysis

174 Statistical analysis was performed using SPSS-20.0
175 (IBM Corporation). A Kruskal-Wallis analysis with
176 Dunn's post-test was used to compare non-parametric
177 data from the three groups, and ANOVA with Newman-
178 Keuls post-test was used for parametric data. The recip-
179 rocal HIA titers were log transformed ($\log_2$) due to
180 skewed distribution. Repeated-measures ANOVA was
181 used to compare the antibody response within each
182 group. The chi-square test was used to compare propor-
183 tions of seroprotected subjects among the groups. Sig-
184 nificance was set at $p < 0.05$.

185 Results

186 Participant characteristics

187 A summary of participant characteristics is shown in
188 Table 1. All groups comprised independently living
189 elderly men with positive self-perceived health, who

performed their routine daily activities without difficul-
ties. Fitness status, as assessed through both the IPAQ
and VO_2max , clearly distinguished the groups, in agree-
ment with their reported lifestyles. Although the IT
group was slightly older than the MT and NT groups,
their mean ages were not significantly different. As
expected, the IT group had the lowest BMI and highest
metabolic equivalent score (METs). The MT group had
a BMI comparable to that of the NT group but signifi-
cantly higher METs. The average length of regular
training reported by both the MT and IT groups was
high and significantly different, 17.0 years and
25.9 years, respectively. All elderly participants reported
yearly influenza vaccination in at least the previous
5 years; however, the total number of previous vaccina-
tions could not be reliably confirmed.

The elderly groups did not differ in most of their
psychosocial characteristics according to the MNA,
GDS-15, and SF36 questionnaires. They presented with
adequate nutritional status, and mild suspected depres-
sion was detected in only one subject within each group.
Assessment of quality of life by the SF-36 showed that
all three groups scored good, very good, or excellent in
most parameters, except for the physical functioning
score, which, as expected, showed a better performance
in the MT and IT groups, even though the NT group
mean score was still very good. Evaluation of mental
status through the MMSE questionnaire showed mean
values indicative of an intact status in all three groups,
although the MT group's score was significantly higher
than that of the NT group.

Antibody responses to trivalent influenza vaccination

NT elderly showed low titers of anti-influenza strain B
antibodies before vaccination (Fig. 2a). Neither at
6 weeks nor at 6 months post-vaccination was there an
increase in these titers. In contrast, both the MT and IT
groups showed a significant increase in the antibody
titers at 6 weeks ($p < 0.001$, Fig. 1a). Interestingly, while
the antibody titers remained elevated at 6 months in the
MT group, in the IT group, they significantly decreased
($p < 0.001$). Thus, by 6 months, the titers in the MT
group, but not in the IT group, were significantly higher
than the pre-vaccination titers ($p < 0.05$). When we com-
pared the three elderly groups, the trained groups
reached higher titers than the NT group. At week 6, both
the MT and IT groups had significantly higher titers than
the NT group ($p < 0.05$), while at 6 months, the

Table 1 Baseline characteristics of participants

Variable	NT <i>n</i> =16	MT <i>n</i> =23	IT <i>n</i> =22	<i>p</i> value for interaction
Age, mean±SE	72.9±1.5	70.4±0.7	74.8±1.5	0.06
BMI, kg/m ²	25.3±0.8	24.7±0.4	23±0.4	0.01: IT vs NT and IT vs MT
METs, min/week	144.7±64.7	1999±156.5	4587±272	0.0001: NT vs MT, NT vs IT and IT vs MT
VO ₂ max, ml/kg/min	24.3±0.6	29.3±1	35±1.4	0.001: NT vs MT 0.0001: NT vs IT 0.007: MT vs IT
Time training, years	0	17±3.2	25.9±3.4	0.007: IT vs MT
Mild suspected depression, GDS-15	1/16	1/23	1/22	0.96
Nutrition, MNA	24.9±0.7	24.8±0.8	26.1±0.6	0.28
Mental status, MMSE	26.1±0.6	28.2±0.4	27.8±1	0.001: NT vs MT
Physical functioning, SF36	80.3±3.5	92±2.3	92.7±2	0.003: NT vs MT; 0.004: NT vs IT
Bodily pain, SF-36	77±5.8	79.5±3.7	82.2±3.8	0.78
General health perceptions, SF-36	73.6±4.4	76.2±3.6	80.7±3.5	0.51
Vitality, SF-36	72.7±3.9	75.4±3.4	67.9±5.3	0.69
Social role functioning, SF-36	79.4±6.8	88.5±5	84±4.4	0.49
Emotional role functioning, SF-36	67.4±9.5	93.3±4.3	74.6±8	0.006: NT vs MT
Mental health, SF-36	78.3±4.1	74.6±3.3	76.7±3.6	0.851

Data presented as mean±SE. *NT* never trained group; *MT* moderately trained group; *IT* intensely trained group. *MMSE* mini-mental state examination: score 25–30: normal; 21–24: mild cognitive decline; 10–20: moderate cognitive decline; <10: severe cognitive decline. *MNA* Mini Nutritional Assessment: score 24–30: normal nutritional status; 17–23.5: at risk of malnutrition; <17: malnourished. *GDS* Geriatric Depression Scale: score 0–4: normal; 5–9: mild depression; 10–15: more severe depression. Quality of life SF-36: score 89–100: excellent; 69–88: very good; 41–68: good; 21–40: fair; <20: poor

difference was significant only for the MT group ($p<0.5$). Interestingly, higher titers were also observed pre-vaccination, although the difference was significant only for the IT group ($p<0.05$).

NT elderly responses to the H3N2 strain followed a pattern similar to those with the B strain (Fig. 1b). There was a slight but significant rise ($p<0.05$) in the titers at week 6, which dropped by 6 months ($p<0.05$) to lower levels, similar to those at pre-vaccination. The trained groups displayed a much sharper rise in titers from pre-vaccination to week 6 ($p<0.001$ for both). By 6 months, the titers in the MT group had dropped to pre-vaccination levels, while in the IT group, the drop was less steep and the antibody titers remained significantly higher than at pre-vaccination ($p<0.05$). As for the B strain, comparison of the three groups showed significantly higher titers in the trained groups at both post-vaccination time points and a trend for higher titers even before vaccination.

Data for the three groups with the H1N1 strain also showed similar patterns to the previous two strains (Fig. 1c). Antibody titers rose significantly after

vaccination (6 weeks) in the 3 groups (NT and MT, $p<0.001$; IT, $p<0.05$), which was followed by a slight but significant drop by 6 months (NT, $p<0.01$; MT and IT, $p<0.05$). Antibody titers were higher pre- and post-vaccination in the IT group, compared with the NT group ($p<0.05$). The MT group also exhibited higher titers than the NT group, although this increase was significant only at pre-vaccination and 6 months post-vaccination ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively).

Of note, there were no significant differences between the MT and IT groups at any time point for all three strains. Thus, both moderate and intense exercise apparently improved, to a similar degree, the influenza vaccination antibody response. To extend further this finding, we analyzed the number of individuals in each group who achieved protective antibody titers ($\geq 1:40$) (Goodeve et al. 1983). Table 2 shows that both the MT and IT groups had higher percentages of seroprotected individuals at 6 weeks and 6 months post-vaccination. Thus, while by week 6 only 33 % of the NT elderly achieved seroprotection for the B strain, over 60 % of the

Fig. 1 Reciprocal anti-influenza B (a), H3N2 (b), and H1N1 (c) antibody dilution in untrained (white triangle) ($n=16$), moderately trained (white circle) ($n=23$), and intensely trained (white square) ($n=22$) elderly, as determined by the hemagglutination inhibition assay, pre-vaccination and 6 weeks and 6 months post-vaccination. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) between the untrained elderly and the moderately and/or intensely trained elderly at the same time point. Plus sign indicates a significant difference between two time-points in the same group; the plus sign on the right indicates a significant difference between 6 months and pre-vaccination

elderly in the trained groups achieved this protection. The percentages of NT seroprotected individuals were higher with the H1N1 (60 %) and H3N2 (66 %) strains, but even higher in the trained groups, especially with the H3N2 strain (83 % in the MT group and 91 % in the IT group). Remarkably, while the percentages of seroprotection decreased slightly or modestly by 6 months, they were still higher in the trained groups, in which 62 to 81 % of the elderly persisted with protective titers against the H1N1 and H3N2 strains; again the B strain elicited weaker responses. However, due to the relatively small sample size, the differences among the groups were not statistically significant (Table 2). Thus, to increase the power of the statistical analysis, we pooled the two trained groups and compared this pooled group (MT/TI) with the NT group. The MT/TI group showed significantly higher percentages of seroprotected individuals at 6 weeks for the B ($p=0.035$) and H2N3 ($p=0.025$) strains and, remarkably, at 6 months with the H1N1 strain ($p=0.032$) while with the B strain, the difference approached significance ($p=0.071$). Thus, these data corroborate the finding of enhanced antibody response to influenza vaccination promoted by an exercise lifestyle.

Discussion

Although it has been postulated that regular exercise positively impacts antibody responses to vaccination in the elderly, the reported effects were heterogeneous in both intensity and duration, reflecting their methodological variability. Schuler et al. showed a positive effect at week 1, but not at weeks 2, 4, and 6 post-vaccination, and this effect was observed for only one of the components of the vaccine (Schuler et al. 2003). Yang et al. observed a positive effect only when data from the three vaccine components were pooled, probably as a consequence of their small sample size (Yang et al. 2007). On the other hand, more consistent findings were reported by Woods'

Table 2 Percentages of seroprotected elderly (titer $\geq 1:40$ on the HIA) to the three influenza antigens of the vaccine

		NT	MT	IT	Chi-square	NT	MT/IT	Chi-square
t2.3	6 weeks post-vaccination							
t2.4	B	$n < 1:40$	10	9	7	10	16	
t2.5		$n \geq 1:40$	5	14	15	5	29	$p=0.035$
t2.6		% seroprotected	33 %	61 %	68 %	33 %	64 %	
t2.7	H3N2	$n < 1:40$	6	4	2	6	6	
t2.8		$n \geq 1:40$	9	19	20	9	39	$p=0.025$
t2.9		% seroprotected	60 %	82 %	91 %	60 %	87 %	
t2.10	H1N1	$n < 1:40$	5	6	6	5	12	
t2.11		$n \geq 1:40$	10	17	16	10	33	$p=0.62$
t2.12		% seroprotected	66 %	73 %	72 %	66 %	73 %	
t2.13	6 months post-vaccination							
t2.14	B	$n < 1:40$	12	10	13	12	23	
t2.15		$n \geq 1:40$	3	12	8	3	20	$p=0.071$
t2.16		% seroprotected	20 %	54 %	38 %	20 %	47 %	
t2.17	H3N2	$n < 1:40$	6	6	4	6	10	
t2.18		$n \geq 1:40$	9	16	17	9	33	$p=0.21$
t2.19		% seroprotected	60 %	72 %	81 %	60 %	76 %	
t2.20	H1N1	$n < 1:40$	10	7	8	10	15	
t2.21		$n \geq 1:40$	5	15	13	5	28	$p=0.032$
t2.22		% seroprotected	33 %	68 %	62 %	33 %	65 %	

One participant in the MT group and IT group each missed the 6-month sampling; one participant of the NT group missed both post-vaccination samplings

NT never trained group, MT moderately trained group, IT intensely trained group, HIA hemagglutination inhibition assay

group, who showed that the high-fitness group responded with a higher antibody response to 2 of the 3 vaccine components, 6 and 24 weeks post-vaccination (Keylock et al. 2007). It should be noted, however, that the high-fitness elderly in that study were compared with very low-fitness elderly, selected mostly in the lower 10th percentile of the $VO_2\text{max}$ data for age and being somewhat older than the high-fitness elderly (67.9 ± 1.2 vs. 64.8 ± 1.2 years old). Two additional reports examined the effect on the primary antibody response to immunization with a novel antigen, KLH (Grant et al. 2008; Smith et al. 2004). One study was interventional (10-month cardiovascular exercise), and the other included endurance-trained elderly. Both studies showed enhancement of IgM and IgG1 but not IgG2 responses, compared with a flexibility exercise intervention group and sedentary elderly group, respectively. Interestingly, in the latter study, there was no correlation between the antibody response enhancement and the fitness improvement evaluated by MET and $VO_2\text{max}$. In our study, we also could not find such correlation (data not shown).

Although controlled interventional studies have some advantages compared with cross-sectional studies, they also have the disadvantage that they represent unnatural, well-controlled scenarios (Rohrbach et al. 2006). Thus, aiming to be closer to the natural scenario, we focused our cross-sectional study on healthy elderly who spontaneously and regularly trained either vigorously (for an average of 26 ± 3 years) or moderately (17 ± 3 years), and compared them with healthy non-trained elderly. All participants had independent lives and managed their everyday activities without difficulty. Our results showed that sustained regular exercise, performed either at a moderate or a high intensity, enhanced the antibody responses to all three components of the influenza vaccine, resulting in higher percentages of seroprotected individuals at both 6 weeks and 6 months post-vaccination. Only one previous study has evaluated two elderly groups on different exercise intensities (Kohut et al. 2002) and found that the highly active elderly, but not the moderately active elderly, had higher antibody responses to influenza vaccine than the

sedentary elderly. Several methodological differences between this study and our study may account for the different results. In the above-referenced study, the level of physical activity was self-reported by a phone interview and referred only to the previous year, and there was no information regarding the number of years the participants had been practicing vigorous or less vigorous (moderate) exercise. Additionally, IgM and IgG ELISA assays that measured total anti-influenza antibody reactivity at only one time point, 2 weeks post-immunization, were used. An interesting finding of our study is that the enhancement effect of exercise was not only observed at the peak response (6 weeks) but also persisted for at least 6 months post-vaccination. This effect seemed to persist for up to a year, as suggested by the trend for higher antibody levels already at pre-vaccination in the trained groups. In fact, the pre-vaccination levels correspond to the subsiding antibody titers produced by the previous year's vaccination, and in both trained groups, the decay tended to be less steep.

Our three elderly groups clearly differed in their fitness status, whether measured through METs or VO_2max , confirming their lifestyle history. It has been shown that psychosocial characteristics can also modulate elderly immune responses to influenza vaccine, although mainly the cell-mediated responses, and not the antibody responses, were affected (Kohut et al. 2005). We thus employed several questionnaires to assess in our groups the psychosocial characteristics that might affect their immunoresponsiveness. Overall, our groups were matched for most characteristics except for those directly influenced by their lifestyles, such as lower BMI in the IT group and lower physical functioning (SF-36) in the NT. Although there were no significant differences in the groups' ages, the IT group was slightly older. However, this difference could potentially have impaired and not favored their higher antibody responses.

This study has limitations. We did not survey the prevalence of flu-like episodes in our elderly. However, the influence of the vaccine on the prevalence of flu-like episodes may be difficult to estimate because of the heterogeneous etiology of these episodes in our setting, with only a small percentage related to influenza virus, even in non-vaccinated populations, <5 % outside the peak season and <25 % at the peak season (Sistema de Vigilância Epidemiológica da Gripe 2012, Brazil). We also did not assess cell-mediated immune responses to the vaccine, which are also affected by aging (McElhaney et al. 2006). Some of the subjects enrolled

in this study participated in a parallel study of the effects of aging on T cells, and in fact, there were several aspects of the biology of these cells that were improved in the trained groups [Silva and de Araújo, manuscript in preparation]; however, the cell-mediated responses to influenza antigens were not examined. Another issue is the size sample. This study allowed us to detect differences among groups, although in a number of instances, there were differences that were close but not significant. A larger sample size could possibly identify more subtle differences among the groups.

In conclusion, we show that either a moderate or an intense training lifestyle leads to stronger and longstanding antibody responses to the influenza vaccine components, resulting in higher percentages of seroprotected individuals.

Acknowledgments This work was supported by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (#2011/08817-0 [GB] and #2011/18268-4 [LCRS]), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (#14952/13-0 [ALA]), and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (LEGL and GB). We thank Terezinha M. Paiva of the Respiratory Diseases Center, Adolf Lutz Institute, São Paulo, for providing the influenza antigens, Magali Ruivo from the Cotia's county program "Saber Viver" for helping with recruitment of the participants, Paulo RS Silva for the ergospirometry testing, and Isac de Castro for statistics advice.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions Adriana L de Araújo, Léia CR Silva, and Juliana R Fernandes contributed to the recruitment of the participants, questionnaires application, blood sampling and processing of the data; Manuella ST Matias and Luiz EG Leme contributed with the recruitment and clinical evaluation of the participants; Lucy SV Boas and Clarisse M Machado standardized and carried out the HIA; Gil Benard and Luiz EG Leme designed and coordinated the study; Gil Benard, Luiz EG Leme, Adriana L de Araújo, and Léia CR Silva wrote the paper.

References

- Agarwal S, Busse PJ (2010) Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* 104(3): 183–190. doi:10.1016/j.anai.2009.11.009, quiz 190–2, 210
- Alam I, Goldeck D, Larbi A et al (2013) Aging affects the proportions of T and B cells in a group of elderly men in a

- developing country—a pilot study from Pakistan. *Age* (Dordr) 35:1521–1530. doi:10.1007/s11357-012-9455-1
- Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P et al (2003) Okamoto. Suggestions for utilization of the mini-mental state examination in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 61:777–781
- Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W et al (1999) Brazilian-Portuguese version of the SF-36. A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol* 39:147–150
- de Araújo AL, Silva LCR, Fernandes JR et al (2013) Preventing or reversing immunosenescence: can exercise be an immunotherapy? *Immunotherapy* 5:879–893. doi:10.2217/imt.13.77
- Goodeve A, Potter CW, Clark A et al (1983) A graded dose study of inactivated surface antigen influenza B vaccine in volunteers. *J Hyg Camb* 90:107–115
- Grant RW, Mariani RA, Vieira VJ et al (2008) Cardiovascular exercise intervention improves the primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) in previously sedentary older adults. *Brain Behav Immun* 22:923–932. doi:10.1016/j.bbi.2008.01.006
- Heck H, Mader A, Hess G, Mucke S, Muller R, Hollmann W (1985) Justification of the 4 mmol/L lactate threshold. *Int J Sports Med* 6:117–130
- Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ (eds) (1982) Concepts and procedures from laboratory-based influenza surveillance. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta
- Keylock KT, Lowder T, Leifheit KA et al (2007) Higher antibody, but not cell-mediated, responses to vaccination in high physically fit elderly. *J Appl Physiol* 102:1090–1098
- Kohut ML, Cooper MM, Nickolaus MS et al (2002) Exercise and psychosocial factors modulate immunity to influenza vaccine in elderly individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57:M557–M562
- Kohut ML, Amtson BA, Lee W et al (2004) Moderate exercise improves antibody response to influenza immunization in older adults. *Vaccine* 22:2298–2306
- Kohut ML, Lee W, Martin A, Amston B et al (2005) The exercise-induced enhancement of influenza immunity is mediated in part by improvements in psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun* 19:357–366
- Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D et al (2008) Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology* 23:64–74. doi:10.1152/physiol.00040.2007
- McElhaney JE, Xie D, Hager WD et al (2006) T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly. *J Immunol* 176:6333–6339
- Milani RV, Lavie CJ, Mehra MR (2004) Cardiopulmonary exercise testing. How do we differentiate the cause of dyspnea? *Circulation* 110:e27–e31
- Pascoe AR, Fiatarone Singh MA, Edwards KM (2014) The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans. *Brain Behav Immun* 39:33–41. doi:10.1016/j.bbi.2013.10.003
- Rohrbach LA, Grana R, Sussman S, Valente TW (2006) Type II translation: transporting prevention interventions from research to real-world settings. *Eval Health Prof* 29(3):302–333
- Santos-Silva PR, Fonseca AJ, Castro AW, Greve JMD, Hernandez AJ (2007) Reproducibility of maximum aerobic power (VO_{2max}) among soccer players using a modified Heck protocol. *Clinics* 62:391–396
- Schuler PB, Leblanc PA, Marzilli TS (2003) Effect of physical activity on the production of specific antibody in response to the 1998–99 influenza virus vaccine in older adults. *J Sports Med Phys Fitness* 43:404
- Senchina DS, Kohut ML (2007) Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging* 2:3–16
- Sistema de vigilância epidemiológica da gripe SIVEP-GRIPE. Vigilância Sentinela Circulação Viral (2012). <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-influenza>. Accessed 21 May 2015
- Smith TP, Kennedy SL, Fleshner M (2004) Influence of age and physical activity on the primary in vivo antibody and T cell-mediated responses in men. *J Appl Physiol* 97:491–498
- Vellas B, Guigoz Y, Garry PJ, Nourhashemi F et al (1999) The Mini Nutritional Assessment (MNA) and its use in grading the nutritional state of elderly patients. *Nutrition* 15:116–122
- Webster R, Cox N, Stohr K (2002) World Health Organization manual on animal influenza diagnosis and surveillance. WHO, Geneva, pp 37–40
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* 22:1041–1050. doi:10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x
- Woods JA, Keylock KT, Lowder T et al (2009) Cardiovascular exercise training extends influenza vaccine seroprotection in sedentary older adults: the immune function intervention trial. *J Am Geriatr Soc* 57:2183–2191. doi:10.1111/j.1532-5415.2009.02563.x
- Yang Y, Verkuilen J, Rosengren KS et al (2007) Effects of a Taiji and Qigong intervention on the antibody response to influenza vaccine in older adults. *Am J Chin Med* 35:597–607
- Yesavage JA, Brink TL, Rose TL et al (1982) Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res* 17:37–49

**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:/...../.....

ENDEREÇO Nº
..... APTO:

BAIRRO:.....CIDADE.....

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

2.RESPONSÁVEL **LEGAL**

.....

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº
..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:
.....

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Impacto da prática da atividade física moderada regular no retardo da imunossenescência de idosos

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 o Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da Faculdade de Medicina da USP, estão desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender os efeitos da atividade física moderada aeróbica regular no sistema imune de idosos, fazendo um estudo detalhado de um componente cromossômico (chamado telômero) além da avaliação da resposta imune. Com estes resultados, espera-se, futuramente, contribuir com novos conhecimentos sobre o envelhecimento do sistema imune e sua possível manipulação 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 coletado 50 mL de sangue do antebraço, para realização de exame laboratorial 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, avaliação clínica e feitura de exames de rotina. Serão coletados 50 mL de sangue (aproximadamente meio copo) distribuídos em 5 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. Está prevista apenas uma coleta. Eventualmente uma segunda 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. Sempre que possível esta coleta será junto com os exames de rotina evitando assim uma coleta extra.

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, Léia Cristina Rodrigues da Silva 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: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.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 divulgado 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 ____/____/____

MINIAVALIAÇÃO NUTRICIONAL

TRIAGEM

A. Nos últimos meses, houve diminuição da ingestão alimentar devido à perda de apetite, problemas digestivos ou dificuldade para mastigar e deglutir?

- (0) diminuição severa da ingestão;
- (1) diminuição moderada da ingestão;
- (2) sem diminuição da ingestão

B. Perda de peso nos últimos meses:

- (0) superior a três quilos;
- (1) não sabe informar;
- (2) entre um e três quilos;
- (3) sem perda de peso

C. Mobilidade:

- (0) restrito ao leito ou à cadeira de rodas;
- (1) deambula, mas não é capaz de sair de casa;
- (2) normal

D. Passou por algum estresse psicológico ou doença aguda nos últimos três meses?

- (0) sim;
- (1) não

E. Problemas neuropsicológicos:

- (0) demência ou depressão graves;
- (1) demência leve;
- (2) sem problemas psicológicos

F. Índice de massa corporal:

- (0) $IMC < 19$;
- (1) $19 \leq IMC \leq 21$;
- (2) $21 \leq IMC \leq 23$;
- (3) $IMC \geq 23$

A. ESCORE TRIAGEM (subtotal, máximo 14 pontos) SOMA DOS PONTOS

.....

- (0) Normal (12 pontos ou mais)
- (1) (1) possibilidade de desnutrição (11 pontos ou menos)

AVALIAÇÃO GLOBAL

G. O paciente vive em sua própria casa (não em casa geriátrica ou hospital):

(0) não

(1) sim

H. Utiliza mais de três medicamentos diferentes por dia?

(0) sim;

(1) não

I. Lesões de pele ou escara?

(0) sim;

(1) não

J. Quantas refeições faz por dia?

(0) uma refeição;

(1) duas refeições;

(2) três refeições

K. O paciente consome:

1. Pelo menos uma porção diária de leite ou derivados (queijo, iogurte)?

(0) sim;

(1) não

2. Duas ou mais porções semanais de legumes ou ovos

(0) sim;

(1) não

3. carnes, peixes ou aves todos os dias:

(0) sim;

(1) não

PONTUAÇÃO:.....

0,0 = Nenhuma ou uma resposta “sim”

0,5 = duas respostas “sim”

1,0 = três respostas “sim”

L. O paciente consome duas ou mais porções diárias de frutas ou vegetais:
(0) não;
(1)sim

M. Quanto copos de líquidos (água, suco, café, chá, leite) o paciente consome por dia?
0,0) menos de três;
0,5) três a cinco copos;
1,0)mais de cinco copos

N. Modo de se alimentar:
(0) não é capaz de se alimentar sozinho;
(1) alimenta-se sozinho, porém com dificuldade;
(2) alimenta-se sozinho sem dificuldade

O. O paciente acredita ter algum problema nutricional?
(0) acredita estar desnutrido;
(1) não sabe dizer;
(2) acredita não ter problema nutricional

P. Em comparação com as pessoas da mesma idade, como o paciente considera a sua própria saúde?
0,0) não muito boa;
0,5) não sabe informar;
1,0) boa;
2,0) melhor

Q. Circunferência do braço (CB) em cm:
0,0= $CB < 21$;
0,5= $21 \leq CB \leq 22$;
1,0= $CB > 22$

R. Circunferência da panturrilha (CP) em cm:
0= $CP < 31$;
1= $CP \geq 31$

B. ESCORE DA AVALIAÇÃO GLOBAL (máximo 16 pontos)

C. ESCORE TOTAL (máximo 30 pontos)

D. SOMA DE A + B

ESCORE DE INDICAÇÃO DE DESNUTRIÇÃO

Bem nutrido: $MAN\ 1 > 23,5$ pontos; Em risco de desnutrição: $17 \leq MAN\ 2 \leq 23,5$ pontos; Desnutrido: $MAN\ 3 < 17$ pontos.

QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA

Nome: _____ Data: ____/____/____

Idade: ____ Sexo: F () M () Você trabalha de forma remunerada: () Sim () Não.

Quantas horas você trabalha por dia: ____ Quantos anos completos você estudou: ____

De forma geral sua saúde está: () Excelente () Muito boa () Boa () Regular () Ruim

Nós estamos interessados em saber que tipos de atividade física as pessoas fazem como parte do seu dia a dia. Este projeto faz parte de um grande estudo que está sendo feito em diferentes países ao redor do mundo. Suas respostas nos ajudarão a entender que tão ativos nós somos em relação à pessoas de outros países. As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **última semana**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são MUITO importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo. Obrigado pela sua participação!

Para responder as questões lembre que:

- Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar MUITO mais forte que o normal
- Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar UM POUCO mais forte que o normal

SEÇÃO 1- ATIVIDADE FÍSICA NO TRABALHO

Esta seção inclui as atividades que você faz no seu serviço, que incluem trabalho remunerado ou voluntário, as atividades na escola ou faculdade e outro tipo de trabalho não remunerado fora da sua casa. **NÃO** incluir trabalho não remunerado que você faz na sua casa como tarefas domésticas, cuidar do jardim e da casa ou tomar conta da sua família. Estas serão incluídas na seção 3.

1a. Atualmente você trabalha ou faz trabalho voluntário fora de sua casa?

() Sim () Não – Caso você responda não **Vá para seção 2: Transporte**

As próximas questões são em relação a toda a atividade física que você fez na **última semana** como parte do seu trabalho remunerado ou não remunerado. **NÃO** inclua o transporte para o trabalho. Pense unicamente nas atividades que você faz por **pelo menos 10 minutos contínuos**:

- 1b. Em quantos dias de uma semana normal você **anda**, durante **pelo menos 10 minutos contínuos**, **como parte do seu trabalho**? Por favor, **NÃO** inclua o andar como forma de transporte para ir ou voltar do trabalho.

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a seção 2 - Transporte.**

- 1c. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** caminhando **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

- 1d. Em quantos dias de uma semana normal você faz atividades **moderadas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como carregar pesos leves **como parte do seu trabalho**?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - **Vá para a questão 1f**

- 1e. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades moderadas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

- 1f. Em quantos dias de uma semana normal você gasta fazendo atividades **vigorosas**, por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como trabalho de construção pesada, carregar grandes pesos, trabalhar com enxada, escavar ou subir escadas **como parte do seu trabalho**:

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - Vá para a questão 2a.

- 1g. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** fazendo atividades físicas vigorosas **como parte do seu trabalho**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 2 - ATIVIDADE FÍSICA COMO MEIO DE TRANSPORTE

Estas questões se referem à forma típica como você se desloca de um lugar para outro, incluindo seu trabalho, escola, cinema, lojas e outros.

- 2a. O quanto você andou na ultima semana de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ dias por **SEMANA** () nenhum - Vá para questão 2c

- 2b. Quanto tempo no total você usualmente gasta **POR DIA** andando de carro, ônibus, metrô ou trem?

_____ horas _____ minutos

Agora pense **somente** em relação a caminhar ou pedalar para ir de um lugar a outro na ultima semana.

- 2c. Em quantos dias da ultima semana você andou de bicicleta por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua o pedalar por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - Vá para a questão 2e.

2d. Nos dias que você pedala quanto tempo no total você pedala **POR DIA** para ir de um lugar para outro?

_____ horas _____ minutos

2e. Em quantos dias da ultima semana você caminhou por **pelo menos 10 minutos contínuos** para ir de um lugar para outro? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a Seção 3.**

2f. Quando você caminha para ir de um lugar para outro quanto tempo **POR DIA** você gasta? (**NÃO** inclua as caminhadas por lazer ou exercício)

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 3 – ATIVIDADE FÍSICA EM CASA: TRABALHO, TAREFAS DOMÉSTICAS E CUIDAR DA FAMÍLIA.

Esta parte inclui as atividades físicas que você fez na ultima semana na sua casa e ao redor da sua casa, por exemplo, trabalho em casa, cuidar do jardim, cuidar do quintal, trabalho de manutenção da casa ou para cuidar da sua família. Novamente pense **somente** naquelas atividades físicas que você faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**.

3a. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer, rastelar **no jardim ou quintal**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3c.**

3b. Nos dias que você faz este tipo de atividades quanto tempo no total você gasta **POR DIA** fazendo essas atividades moderadas **no jardim ou no quintal**?

_____ horas _____ minutos

- 3c.** Em quantos dias da ultima semana você fez atividades **moderadas** por pelo menos 10 minutos como carregar pesos leves, limpar vidros, varrer ou limpar o chão **dentro da sua casa**.

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 3e.**

- 3d.** Nos dias que você faz este tipo de atividades moderadas **dentro da sua casa** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

- 3e.** Em quantos dias da ultima semana você fez atividades físicas **vigorosas** **no jardim ou quintal** por pelo menos 10 minutos como carpir, lavar o quintal, esfregar o chão:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para a seção 4.**

- 3f.** Nos dias que você faz este tipo de atividades vigorosas **no quintal ou jardim** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 4- ATIVIDADES FÍSICAS DE RECREAÇÃO, ESPORTE, EXERCÍCIO E DE LAZER.

Esta seção se refere às atividades físicas que você fez na ultima semana unicamente por recreação, esporte, exercício ou lazer. Novamente pense somente nas atividades físicas que faz **por pelo menos 10 minutos contínuos**. Por favor, **NÃO** inclua atividades que você já tenha citado.

4a. Sem contar qualquer caminhada que você tenha citado anteriormente, em quantos dias da ultima semana você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos no seu tempo livre?

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4c**

4b. Nos dias em que você caminha no seu tempo livre, quanto tempo no total você gasta POR DIA?

_____ horas _____ minutos

4c. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades moderadas no seu tempo livre por pelo menos 10 minutos, como pedalar ou nadar a velocidade regular, jogar bola, vôlei, basquete, tênis:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para questão 4e.**

4d. Nos dias em que você faz estas atividades moderadas no seu tempo livre quanto tempo no total você gasta POR DIA?

_____ horas _____ minutos

4e. Em quantos dias da ultima semana você fez atividades **vigorosas no seu tempo livre** por pelo menos 10 minutos, como correr, fazer aeróbicos, nadar rápido, pedalar rápido ou fazer Jogging:

_____ dias por **SEMANA** () Nenhum - **Vá para seção 5.**

4f. Nos dias em que você faz estas atividades vigorosas **no seu tempo livre** quanto tempo no total você gasta **POR DIA**?

_____ horas _____ minutos

SEÇÃO 5 - TEMPO GASTO SENTADO

Estas últimas questões são sobre o tempo que você permanece sentado todo dia, no trabalho, na escola ou faculdade, em casa e durante seu tempo livre. Isto inclui o tempo sentado estudando, sentado enquanto descansa, fazendo lição de casa visitando um amigo, lendo, sentado ou deitado assistindo TV. Não inclua o tempo gasto sentando durante o transporte em ônibus, trem, metrô ou carro.

5a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

_____ horas _____ minutos

5b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

_____ horas _____ minutos

CENTRO COORDENADOR DO IPAQ NO BRASIL– CELAFISCS -

INFORMAÇÕES ANÁLISE, CLASSIFICAÇÃO E COMPARAÇÃO DE RESULTADOS NO BRASIL

011-42298980 ou 42299643. celafiscs@celafiscs.com.br

www.celafiscs.com.br IPAQ Internacional: www.ipaq.ki.se

Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida-SF-36

Nome: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Função exercida no trabalho: _____

Há quanto tempo exerce essa função: _____

Instruções: Esta pesquisa questiona você sobre sua saúde. Estas informações nos manterão informados de como você se sente e quão bem você é capaz de fazer atividades de vida diária. Responda cada questão marcando a resposta como indicado. Caso você esteja inseguro em como responder, por favor, tente responder o melhor que puder.

1- Em geral você diria que sua saúde é:

Excelente	Muito Boa	Boa	Ruim	Muito Ruim
1	2	3	4	5

2- Comparada há um ano atrás, como você classificaria sua idade em geral, agora?

Muito Melhor	Um Pouco Melhor	Quase a Mesma	Um Pouco Pior	Muito Pior
1	2	3	4	5

3- Os seguintes itens são sobre atividades que você poderia fazer atualmente durante um dia comum. Devido à sua saúde, você teria dificuldade para fazer estas atividades? Neste caso, quando?

Atividades	Sim, dificulta muito	Sim, dificulta um pouco	Não, não dificulta de modo algum
a) Atividades Rigorosas, que exigem muito esforço, tais como correr, levantar objetos pesados, participar em esportes árduos.	1	2	3
b) Atividades moderadas, tais como mover uma mesa, passar aspirador de pó, jogar bola, varrer a casa.	1	2	3
c) Levantar ou carregar mantimentos	1	2	3
d) Subir vários lances de escada	1	2	3
e) Subir um lance de escada	1	2	3
f) Curvar-se, ajoelhar-se ou dobrar-se	1	2	3
g) Andar mais de 1 quilômetro	1	2	3
h) Andar vários quarteirões	1	2	3
i) Andar um quarteirão	1	2	3
j) Tomar banho ou vestir-se	1	2	3

4- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou com alguma atividade regular, como consequência de sua saúde física?

	Sim	Não
a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Esteve limitado no seu tipo de trabalho ou a outras atividades.	1	2
d) Teve dificuldade de fazer seu trabalho ou outras atividades (p. ex. necessitou de um esforço extra).	1	2

5- Durante as últimas 4 semanas, você teve algum dos seguintes problemas com seu trabalho ou outra atividade regular diária, como consequência de algum problema emocional (como se sentir deprimido ou ansioso)?

	Sim	Não
a) Você diminuiu a quantidade de tempo que se dedicava ao seu trabalho ou a outras atividades?	1	2
b) Realizou menos tarefas do que você gostaria?	1	2
c) Não realizou ou fez qualquer das atividades com tanto cuidado como geralmente faz.	1	2

6- Durante as últimas 4 semanas, de que maneira sua saúde física ou problemas emocionais interferiram nas suas atividades sociais normais, em relação à família, amigos ou em grupo?

De forma nenhuma	Ligeiramente	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

7- Quanta dor no corpo você teve durante as últimas 4 semanas?

Nenhuma	Muito leve	Leve	Moderada	Grave	Muito grave
1	2	3	4	5	6

8- Durante as últimas 4 semanas, quanto a dor interferiu com seu trabalho normal (incluindo o trabalho dentro de casa)?

De maneira alguma	Um pouco	Moderadamente	Bastante	Extremamente
1	2	3	4	5

9- Estas questões são sobre como você se sente e como tudo tem acontecido com você durante as últimas 4 semanas. Para cada questão, por favor, dê uma resposta que mais se aproxime de maneira como você se sente, em relação às últimas 4 semanas.

	Todo Tempo	A maior parte do tempo	Uma boa parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nunca
a) Quanto tempo você tem se sentindo cheio de vigor, de vontade, de força?	1	2	3	4	5	6
b) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa muito nervosa?	1	2	3	4	5	6
c) Quanto tempo você tem se sentido tão deprimido que nada pode animá-lo?	1	2	3	4	5	6
d) Quanto tempo você tem se sentido calmo ou tranquilo?	1	2	3	4	5	6
e) Quanto tempo você tem se sentido com muita energia?	1	2	3	4	5	6
f) Quanto tempo você tem se sentido desanimado ou abatido?	1	2	3	4	5	6
g) Quanto tempo você tem se sentido esgotado?	1	2	3	4	5	6
h) Quanto tempo você tem se sentido uma pessoa feliz?	1	2	3	4	5	6
i) Quanto tempo você tem se sentido cansado?	1	2	3	4	5	6

10- Durante as últimas 4 semanas, quanto de seu tempo a sua saúde física ou problemas emocionais interferiram com as suas atividades sociais (como visitar amigos, parentes, etc)?

Todo Tempo	A maior parte do tempo	Alguma parte do tempo	Uma pequena parte do tempo	Nenhuma parte do tempo
1	2	3	4	5

11- O quanto verdadeiro ou falso é cada uma das afirmações para você?

	Definitivamente verdadeiro	A maioria das vezes verdadeiro	Não sei	A maioria das vezes falso	Definitivamente falso
a) Eu costumo adoecer um pouco mais facilmente que as outras pessoas	1	2	3	4	5
b) Eu sou tão saudável quanto qualquer pessoa que eu conheço	1	2	3	4	5
c) Eu acho que a minha saúde vai piorar	1	2	3	4	5
d) Minha saúde é excelente	1	2	3	4	5

Questionário Depressão

	Escore		Observada (%)	Esperada (%)	Kappa
	Não	Sim			
1. Você está basicamente satisfeito com sua vida? ^{10,4,1}	1	0	47,1	43,7	0,06
2. Você deixou muitos de seus interesses e atividades? ^{10,4}	0	1	74,5	66,4	0,24
3. Você sente que sua vida está vazia?	0	1	74,5	64,0	0,29
4. Você se aborrece com frequência? ¹⁰	0	1	66,7	57,8	0,21
5. Você se sente de bom humor a maior parte do tempo? ¹⁰	1	0	60,8	44,2	0,30
6. Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer?	0	1	68,6	47,7	0,40
7. Você se sente feliz a maior parte do tempo? ^{10,4}	1	0	72,5	49,8	0,45
8. Você sente que sua situação não tem saída? ¹⁰	0	1	70,6	51,1	0,40
9. Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?	0	1	49,0	47,2	0,03

10.Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?	0	1	76,5	54,0	0,49
11. Você acha maravilhoso estar vivo?	1	0	76,5	63,7	0,35
12. Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?	0	1	72,5	58,9	0,33
13.Você se sente cheio de energia?	1	0	52,9	44,5	0,15
14.Você acha que sua situação é sem esperanças?	0	1	78,4	72,6	0,21
15.Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você? 10	0	1	52,9	50,9	0,04

NOTA: Os números 10, 4 e 1 que aparecem ao lado das questões indicam os ítems incluídos na GDS-10, GDS-4 e GDS-1 respectivamente.

MINI-EXAME DO ESTADO MENTAL

ORIENTAÇÃO TEMPORAL		EVOCAÇÃO	
☐ ☐ dia 5 ☐ mês ☐ ano ☐ dia da semana ☐ hora aproximada (aceite erro de até uma hora)		☐ carro 3 ☐ vaso ☐ tijolo	
ORIENTAÇÃO ESPACIAL		NOMEAÇÃO	
☐ local específico (apontando para o chão: saia) 5 ☐ local geral (apontando ao redor: prédio) ☐ bairro ou rua próxima ☐ cidade ☐ estado		☐ relógio 2 ☐ caneta	
MEMÓRIA IMEDIATA		REPETIÇÃO	
☐ carro 3 ☐ vaso ☐ tijolo Pontue as palavras repetidas na primeira tentativa Se houver erros, repita até 3 vezes para o aprendizado		☐ Nem aqui, nem ali, nem lá 1	
		COMANDO	
		☐ Pegue esse papel com a mão direita, 3 ☐ dobre-o ao meio e ☐ ponha-o no chão Se pedir ajuda no meio da tarefa, não dê dicas	
		LEITURA	
		☐ feche os olhos 1 Não auxilie se pedir ajuda ou ler a frase sem realizar o comando.	
		ESCRITA	
		☐ frase 1 Se não compreender ajude com: "alguma frase que tenha começo, meio e fim", "alguma coisa que aconteceu hoje", "alguma coisa que queira dizer". Aceitar erros gramaticais e ortográficos	
CÁLCULOS		CÓPIA DO DESENHO	
☐ 100 – 7 5 ☐ 93 – 7 ☐ 86 – 7 ☐ 79 – 7 ☐ 72 – 7 Se houver erro corrija e prossiga. Considere correto se o indivíduo se corrigir espontaneamente		☐ pentágonos interseccionados 1 Aceite apenas dois pentágonos com intersecção formando uma figura de quatro lados	

TOTAL: _____

TESTE DO DESENHO DO RELÓGIO

Dê uma folha de papel em branco e diga:

“Desenhe um relógio com todos os números. Coloque ponteiros marcando 2h e 45min”

PONTUAÇÃO:

→Os números estão corretos

10- Hora certa.

9- Leve distúrbio nos ponteiros (p ex.: ponteiro das horas sobre 02).

8- Distúrbios mais intensos nos ponteiros (p. ex.: anotando 2:20).

7- Ponteiros completamente errados.

6- Uso inapropriado (p. ex.: uso de código digital ou de círculos envolvendo números).

→Os números estão incorretos

5- Números em ordem inversa ou concentrados em alguma parte do relógio.

4- Número faltando ou situados fora dos limites do relógio.

3- Números e relógio não mais conectados. Ausência de ponteiros.

2- Alguma evidência de ter entendido as instruções, mas com vaga semelhança com um relógio.

1- Não tentou ou não conseguiu representar um relógio,