Adriana Ladeira de Araújo

**Efeito do exercício físico regular e intenso no
sistema imune de idosos**

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

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Gil Benard

São Paulo
2015

Adriana Ladeira de Araújo

**Efeito do exercício físico regular e intenso no
sistema imune de idosos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para 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

Araújo, Adriana Ladeira de

Efeito do exercício físico regular e intenso no sistema imune de idosos / Adriana Ladeira de Araújo. -- São Paulo, 2015.

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

Orientador: Gil Benard.

Descritores: 1.Sistema imunológico 2.Telômero 3.Exercício 4.Idoso
5.Envelhecimento 6.Citocinas

USP/FM/DBD-202/15

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).

Guia de apresentação e dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Cordeiro 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 Documentações; 2012

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List Journals Indexed in Index Medicus*.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gil Benard, por quem tenho grande admiração e respeito, agradeço pela oportunidade, apoio, confiança, dedicação e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Duarte, pelo acolhimento no LIM-56.

Aos colaboradores, Dr. Luiz Garcez Leme e Dra. Manuella Toledo do Instituto de Ortopedia e Traumatologia IOT-FMUSP, por auxiliar no recrutamento e avaliação clínica dos indivíduos participantes deste estudo.

À Dra. Clarice Machado e Lucy Villas Boas, do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP), por auxiliar na quantificação da resposta vacinal anti-*Influenza*.

À Dra. Terezinha Paiva, do Núcleo de Doenças Respiratórias IAL, pelo fornecimento dos antígenos para detecção de anticorpos contra o vírus da *Influenza*.

Ao fisiologista Paulo Roberto Silva, do Laboratório de Estudos do Movimento LEM- IOT FMUSP, pela cuidadosa realização dos testes ergoespirométricos nos participantes do estudo.

À Magali Ruivo, do Programa Saber Viver de Cotia-SP, pela sua dedicação e por auxiliar no recrutamento de parte dos indivíduos participantes do estudo.

À Dra. Beatrice Macchi, da *Università degli Studi di Roma Tor Vergata*, por me acolher em seu laboratório e contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Isac de Castro, Bioestatístico da FMUSP, por auxiliar com as análises estatísticas.

À amiga Léia Rodrigues, pela amizade, por me acolher, confiar e ensinar, por auxiliar em cada etapa na realização deste projeto, por me apoiar e aconselhar em todos os momentos.

À amiga Juliana Ruiz, que doou toda sua dedicação e empenho para a concretização deste projeto, pela amizade, pelo carinho, por compartilhar momentos agradáveis juntas.

As amigas do LIM-56, Rosana Domingues, Laís Teodoro, Liã Barbara, Ana Paula Vieira, e demais colegas do laboratório, por tornar o meu dia a dia mais agradável.

À Noemia Orie, pelos valiosos ensinamentos de Citometria de Fluxo.

Aos participantes deste estudo, que doaram seus tempos e otimismo em nome da Ciência.

À minha família, por todo apoio e compreensão, dedicação e amor.

A Deus, por mais uma realização.

À CAPES e FAPESP pelo suporte financeiro

A todos que participaram desta etapa da minha vida, pelos incentivos e atenções, contribuições essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	36
2. Objetivos	43
3. Casuística e métodos.....	45
3.1- Recrutamento da casuística.....	45
3.2- Coleta e processamento das amostras	45
3.2.1- Caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ no sangue periférico.....	46
3.2.2- Purificação celular de linfócitos T CD4+	48
3.2.2.1- Obtenção de linfócitos T CD45RO+ e CD45RO-	49
3.2.3- Purificação celular de linfócitos T CD8+	51
3.2.3.1- Obtenção de linfócitos T CD8+CD28+ e T CD8+CD28-.....	53
3.2.4- Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente com análise por citometria de fluxo (<i>Flow-FISH</i>)	55
3.2.4.1- Identificação dos linfócitos e células 1301 após <i>Flow- FISH</i>	56
3.2.5- Cultura de PBMC	59
3.2.6- Avaliação da proliferação celular	59
3.2.7- Dosagem de citocinas	63
3.2.7.1- Em sobrenadantes de cultura	63
3.2.7.2- No soro.....	63

3.2.8- Expressão de marcadores de apoptose <i>in vitro</i>	64
3.2.9- Quantificação da resposta vacinal contra <i>Influenza</i>	67
4. Análise estatística	70
5. Resultados.....	73
5.1- Parâmetros demográficos antropométricos e laboratoriais	73
5.1.1- Determinação do nível de atividade física	77
5.2- Parâmetros imunológicos	81
5.2.1- Caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no sangue periférico.....	81
5.2.2- Avaliação do comprimento do telômero em linfócitos do sangue periférico.....	87
5.2.2.1- Análise intra grupo do comprimento do telômero	89
5.2.2.2- Análise inter grupo do comprimento do telômero	92
5.2.3- Avaliação da capacidade de resposta proliferativa dos linfócitos TCD4 ⁺ e linfócitos T CD8 ⁺	9Erro! Indicador não definido.
5.2.4- Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura	96
5.2.6- Dosagem de citocinas no soro.....	98
5.2.7- Avaliação da expressão de marcadores de apoptose em subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	99
5.2.7.1- Expressão de Caspase-3 em linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ vs CD4 ⁺ CD45RO ⁻	99
5.2.7.2- Expressão de Caspase-3 em linfócitos T CD8 ⁺ CD28 ⁺ vs. CD8 ⁺ CD28 ⁻	101
5.2.7.3- Expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD4 ⁺ CD45RO ⁺ vs. CD4 ⁺ CD45RO ⁻	102
5.2.7.4- Expressão de Bcl-2 em linfócitos TCD8 ⁺ CD28 ⁺ vs. CD8 ⁺ CD28 ⁻	104

5.2.8- Quantificação da resposta Vacinal anti- <i>Influenza</i>	105
6. Discussão	113
7. Conclusão.....	126
8. Anexos	128
9. Referências	13

Erro! Indicador não definido.

Lista de Abreviaturas

AGA	Avaliação Geriátrica Global
ALO	Aspartato aminotransferase
ALP	Alanina aminotransferase
APC	Alofococianina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxide
FA	Fosfatase alcalina
FasL	Faz ligante
FBS	Soro Fetal Bovino
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isoticionato de fluoresceína
GAMA GT	Gamaglutamil tranferase
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IMF	Intensidade média de fluorescência
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IPAQ	<i>International physical activity questionnaire</i>
Kbp	Kilo pares de base
LPS	Lipopolissacarídeo

MAN	Mini avaliação nutricional
MC	Memória central
ME	Memória efetora
MEEM	Mini exame do estado mental
MET	<i>Metabolic equivalent</i>
MG	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Proteína C Reativa
PE	Ficoeritrina
pFAK	<i>Phosphorilated Focal Adhesion Kinase</i>
PI	Iodeto de Propídeo
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i>
PTH	Paratormônio.
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SF-36	<i>Short Form-36 Quality of life</i>
T.A.	Temperatura Ambiente
T4 livre	Tiroxina livre
TCR	Receptor de célula T
T _{emra}	<i>T Effector-Memory cells with reacquired RA</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRF	Fragmentos de restrição terminal

TSH	hormônio tiroestimulante
Zn^{2+}	íon Zinco
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de fenotipagem <i>ex vivo</i>	47
Figura 2. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de purificação celular (T CD4+)	49
Figura 3. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de purificação celular (CD45RO+ e CD45RO-)	51
Figura 4. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de purificação celular (T CD8+)	5
Figura 5. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de purificação celular (CD28+ e CD28-)	55
Figura 6. Cultivo de células de linhagem 1301	56
Figura 7. Avaliação do comprimento do telômero de linfócitos T	58
Figura 8. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para todos os ensaios de linfoproliferação	62
Figura 9. Estratégia de <i>gate</i> utilizada para os ensaios de apoptose.....	65
Figura 10. Pontuação do IPAQ	78
Figura 11. Dados do teste ergoespirométrico	80
Figura 12. Análise das subpopulações T CD4+ e TCD8+ do sangue periférico e relação CD4:CD8	8
Figura 13. A análise da distribuição das células naive, memória central, memória efetora e terminalmente diferenciada nos linfócitos TCD4+	84
Figura 14. A análise da distribuição das células naive, memória central, memória efetora e terminalmente diferenciada nos linfócitos TCD8+	85
Figura 15. Análise da distribuição das células CD28+ e CD28 ^{neg} nas subpopulações TCD8+ do sangue periférico	86
Figura 16. Análise da distribuição das células CD28+ e CD28 ^{neg} nas subpopulações T CD4+ do sangue periférico	87
Figura 17. Determinação do comprimento do telômero em linfócitos TCD3 ⁺	88

Figura 18. Determinação do comprimento do telômero nas subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	89
Figura 19. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ <i>naive</i> e de memória	90
Figura 20. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD8 ⁺ não senescente e senescente.....	91
Figura 21. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	92
Figura 22. Análise da capacidade linfoproliferativa frente à PHA nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ naive (RO ⁻) e de memória (RO ⁺)9Erro! Indicador não definido.	
Figura 23. Análise da capacidade linfoproliferativa frente a PHA nos subtipos de linfócitos T CD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺) e senescentes (CD28 ⁻)	95
Figura 24. Análise da capacidade linfoproliferativa frente ao CMV nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ naive (RO ⁻)/memória (RO ⁺) e T CD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺)/ senescentes (CD28 ⁻)	96
Figura 25. Secreção de citocinas com padrão Th1 e Th2	97
Figura 26. Análise da apoptose <i>in vitro</i> , expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ <i>naive</i> (CD45RO ⁻)/memória (CD45RO ⁺).....	100
Figura 27. Análise da apoptose <i>in vitro</i> , expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos T CD8 ⁺ não senescentes (CD28 ⁺)/ senescentes (CD28 ⁻)	102
Figura 28. Análise da apoptose <i>in vitro</i> , expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos T CD4 ⁺ <i>naive</i> (RO ⁻)/memória (RO ⁺).....	103
Figura 29. Análise da apoptose <i>in vitro</i> , expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos T CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD28 ⁻	104
Figura 30. Análise do comportamento antigênico das cepas H3N2, H1N1 e Influenza B.....	106

Figura 31. Cinética dos títulos de anticorpos anti- <i>Influenza</i> B.....	107
Figura 32. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H1N1.....	108
Figura 33. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H3N2.....	110

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados dos grupos de estudo	74
Tabela 2. Dados do SF36.....	75
Tabela 3. Dados de investigação laboratorial.....	76
Tabela 4. Subpopulações de linfócitos T do sangue periférico	82
Tabela 5. Dosagens séricas de citocinas no soro dos idosos por CBA	99

Araujo AL. *Efeito do exercício físico regular e intenso no sistema imune de idosos*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2015.

Imunossenescência, termo que designa o envelhecimento do sistema imune, contribui com o aumento das infecções, doença autoimune, câncer e baixa eficiência das vacinações, favorecendo o aumento da morbi-mortalidade entre os indivíduos idosos. Dentre as mudanças, destacam-se as alterações no tamanho da subpopulação de célula T, com aumento de células de memória e diminuição de células *naive*; no padrão de secreção de citocinas, na capacidade de replicação das células e na produção de anticorpos, as quais culminam em um estado pró-inflamatório chamado 'inflamm-aging' e uma capacidade diminuída para responder a novos antígenos. Além disto, o acúmulo de linfócitos T CD8+CD28- nos idosos também se correlaciona com uma diminuição do controle sobre a infecção. No entanto, há poucos relatos sobre o papel do exercício regular na prevenção ou tratamento de imunossenescência. O objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da atividade física intensa e regular na imunossenescência de idosos. Foram selecionados 15 indivíduos idosos em treinamento intenso de corrida (meia maratona e/ou maratona há pelo menos 5 anos, TI), e 16 indivíduos idosos não praticantes de atividade física, NT. Todos os indivíduos eram do sexo masculino, com idade entre 65 a 85 anos, apresentavam auto percepção de saúde positiva e ausência de co-morbidades e/ou em tratamento com impacto significativo para o sistema imune. Foram avaliadas as subpopulações de células T (CD8+CD28+ e CD8+CD28-; CD4+ *naive* e de memória) em relação ao comprimento de seus telômeros, resposta proliferativa e marcadores de apoptose, síntese de citocinas (Th1/Th2); níveis séricos de citocinas inflamatórias; frequência das subpopulações (*naive*, memória central, memória efetora e terminalmente diferenciada) dos linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico e a quantificação da produção de anticorpos anti-*Influenza*. Verificamos no grupo TI, em relação ao NT, aumento de células T_{ME} e diminuição de T_{EMRA}; maior proliferação de linfócitos T CD4+ *naive* estimulados com mitógeno; maior comprimento do telômero em linfócitos T CD3+, T CD3+CD8+ e T CD3+CD8+CD28-, esta última considerada subpopulação associada à imunossenescência; preservação dos mecanismos anti-apoptóticos, verificado pelo aumento da expressão *in vitro* de Bcl-2 e redução de caspase-3 em células TCD4+ (memória e *naive*) e T CD8+ (senescentes e não senescentes) não estimuladas; parâmetros estes denotando uma provável melhor capacidade funcional de células T. Além disso, verificamos aumento da produção sérica de títulos de anticorpos anti-influenza pré e pós-vacinação, evidenciando possível papel adjuvante do exercício intenso na resposta vacinal. E finalmente, observamos equivalência entre os dois grupos com relação ao padrão de secreção de citocinas séricas e secretadas *in vitro* associadas com o *Inflammaging*. Os resultados evidenciaram que a prática da atividade física intensa e regular teria um efeito protetor contra alguns parâmetros associados à imunossenescência.

Descritores: sistema imunológico; telômero; exercício; idoso; envelhecimento; citocinas.

Abstract

Araujo AL. *Effect of regular and intense physical exercise on the immune system of the elderly*. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2015.

Immunosenescence, the term used to designate the process of aging of the immune system, is associated with to the increased rate of infections, autoimmune diseases, cancer and low efficiency of vaccinations in elderly, favoring their increased morbidity and mortality. Immunosenescence is associated with changes in the size of the T cell subpopulation with increased proportion of memory T cells and decrease proportion of naive T cells, in the pattern of cytokine secretion, in cell replication capability and in antibody production, all of which culminate in a pro-inflammatory state called "inflamm-aging" and diminished capacity to responding to new antigens. In addition, the accumulation of CD8+CD28- lymphocytes in elderly also correlates with a decreased control of infections. However, there are few reports on the role of chronic regular exercise in the prevention or treatment of immunosenescence. The objective of this study was to investigate the effects of intense regular physical activity on immunosenescence of elderly men. We selected 15 elderly men with intensive training for at least the last 5 years (IT, participating in half marathon and/or marathon), and 16 elderly men not training, NT. They were 65-85 years and had self perception of positive health and lack of co-morbidities and/or treatment with significant impact on the immune system. T-cell subpopulations were assessed (CD8+CD28+ and CD8+CD28-; CD4+ naive and memory) with respect to telomere length, proliferative responses, apoptosis markers, cytokine synthesis (Th1/Th2); serum levels of inflammatory cytokines; distribution of the naive, central memory, effector memory, and terminally differentiated CD4+ and CD8+ lymphocyte subpopulations in peripheral blood, and anti-influenza antibodies production. We found in the IT group, compared with the NT, in the T-cell subsets, increased percentages of effector memory T-cells and decreased percentages of terminally differentiated T-cells; higher proliferation of naive CD4+T cells stimulated with mitogen; larger telomere length in TCD3+, TCD3+CD8+ and TCD3+CD8+CD28- cells (the latter subset being a marker of immunosenescence), preservation of the anti-apoptotic mechanisms, indicated by increased Bcl-2 expression and decreased caspase-3 expression in *in vitro* resting memory and naive CD4+ T-cell and in senescent and non-senescent CD8+ T-cells; all of which denote a potentially better T-cell functioning. There was also increased anti-influenza antibody titers pre and post-vaccination, indicating a possible adjuvant role of intense exercise in vaccine responses. Finally there was a similar pattern between the two groups in *in vitro* secreted and in serum cytokines associated with Inflamm-aging. The results showed that the practice of regular intense physical activity has a protective effect against some parameters associated with immunosenescence.

Keywords: immune system; telomere; exercise; aged; aging; cytokines.

1. Introdução

O aumento sem precedentes na expectativa de vida da população propicia o interesse em compreender melhor o processo de envelhecimento, uma vez que este está associado a uma maior prevalência das neoplasias e doenças relacionadas à idade (1). De acordo com números divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2013 a expectativa de vida ao nascer no Brasil passou de 74,1 anos para 74,9 anos (para ambos os sexos), apresentando um aumento em relação a 2011.

Atualmente, o Brasil se encontra 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. Enquanto a população de idosos com idade acima dos 60 anos aumentará em velocidade acelerada (2 a 4% ao ano), a população jovem diminuirá. De acordo com projeções das Nações Unidas, a proporção de idosos que subiu para 3,1% em 1970 aumentará para 19% em 2050. Vale ressaltar que diversos fatores socioeconômicos influenciam diretamente a expectativa de vida, incluindo o serviço de saneamento ambiental, alimentação, índice de violência, poluição, serviços de saúde, educação, taxas de fecundidade, fertilidade e mortalidade, dentre outros. Estes fatores explicam porque a estabilidade no crescimento populacional dos idosos entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento ocorre de maneira desigual. Enquanto em países desenvolvidos o aumento da população de idosos ocorreu de maneira gradual, no Brasil não houve um melhor planejamento para as condições de vida desta faixa etária, fato que irá repercutir no aumento do número absoluto de pessoas acima de 60 anos nas próximas décadas (2).

Neste contexto, Alex Confort (1979) [3] define a senescência como a incapacidade de manutenção da homeostasia, em condições de sobrecarga funcional, o que reflete na perda das capacidades adaptativas com o avanço da idade, apesar de não apresentar prejuízo na qualidade de vida dos idosos. Entretanto muitos aspectos ainda não estão claros sobre o limite entre o envelhecimento fisiológico e a senilidade (processo patológico do envelhecimento). Neste contexto, a atenção médica é de fundamental importância, para que o processo natural do envelhecimento não seja confundido com doença, ou mesmo uma doença tratável passe despercebida como condição associada à idade (4). Sendo assim, para os idosos, as infecções apresentam maior morbidade e mortalidade, constituindo-se em fator de alto risco. É importante ressaltar que o envelhecimento consiste no acúmulo e interação de mudanças clínicas, comportamentais e sociais durante toda a vida, sendo assim, os determinantes de saúde

que exercem tal influência incluem a biologia (características genéticas e fisiológicas), estilo de vida e o meio ambiente (nas suas dimensões físicas e sociais) que interagem no indivíduo. Neste sentido, o perfil da morbi-mortalidade do idoso pode ser influenciado por intervenção populacional, que promovem a saúde e previnem as doenças, tendo como objetivos básicos, aumentar a longevidade, sobretudo, recuperar, retardar a senescência, preservar ou manter a funcionalidade (autonomia e independência), ou seja, a qualidade de vida.

De acordo com Arnold *et al.*, 2011 (5), a garantia da longevidade e do envelhecimento saudável 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 (6).

A 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 (6). Destacam-se as infecções do trato gastrointestinal, aumento da susceptibilidade a desenvolver autoimunidade e câncer, bem como a diminuição da capacidade de resposta às imunizações (7,8). Estes fatores contribuem para a exaustão imunológica, principalmente no compartimento de células T da imunidade adaptativa (1), entretanto, também afetam, em menor proporção, a funcionalidade das células B (9) e o sistema imune inato (10).

Muitos tipos celulares são afetados na imunossenescência, incluindo as células-tronco-hematopoiéticas, os progenitores linfóides e linfócitos maduros dos órgãos linfóides secundários e da periferia (11). Sua característica é a mudança na composição celular do compartimento dos linfócitos T, ou seja, há uma diminuição no número de células com o fenótipo *naive*, com o aumento do número de células com fenótipo de memória. A involução tímica está diretamente ligada à redução do número de precursores celulares e declínio da função das células tronco hematopoiéticas. Isto ocorre, pois, no nascimento o timo está totalmente desenvolvido, porém a partir da puberdade ele inicia um processo de involução, no qual o tecido funcional é substituído por tecido fibroadiposo. Este processo prossegue por toda a vida adulta do ser humano,

estando completo por volta dos sessenta anos (12, 13). Com a involução tímica o “pool” de linfócitos T diminui drasticamente, em torno de 80%, reduzindo a capacidade do sistema imune adaptativo de responder a novos estímulos antigênicos. Esta diminuição é verificada tanto nos órgãos linfóides, como na periferia (14).

Além destes efeitos da imunossenescência, tem-se na imunidade inata o aumento do *background* inflamatório, termo denominado inflamm-aging. É definido pela inflamação de baixo grau, sistêmica e crônica verificada durante o envelhecimento fisiológico, caracterizado por elevados níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF-alfa, proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa (PCR), além da diminuição de IL-10, fato que compromete a capacidade de manutenção da homeostase imunológica (15). Defeitos funcionais nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e elevado número de células Natural Killer (NKs) também são observados na imunossenescência. As alterações que comprometem a imunidade adaptativa incluem as mudanças nas populações celulares, redução da função mediada por células imunes, além da redução do comprimento dos telômeros, sequências hexaméricas de DNA (16, 17), cuja principal função é definida pela sua função protetora dos terminais dos cromossomos (18, 19). Este fato pode ser evidenciado em estudo que analisou o comprimento dos telômeros em células T CD8+CD28- (dita como senescente, devido a perda da molécula co-estimulatória CD28) e células T CD8+CD28+ de indivíduos saudáveis, para se avaliar o histórico replicativo. Os resultados apresentaram comprimento do telômero significativamente menor na subpopulação T CD8+CD28-, fato que condiz com os ciclos de replicação sofridos por estas células, presumivelmente em resposta à exposição antigênica, caracterizando a possível entrada no estado de senescência replicativa (20). Segundo os autores, estes dados são análogos aos do estudo de células T CD4+, desenvolvido por Weng *et al.*, 1995 (21), em que células T CD4+ de memória apresentaram menor comprimento do telômero do que células T CD4+ *naive* (20, 21). Tais evidências têm sido relatadas como preditoras de incompetência imunológica nos indivíduos idosos (22, 23).

Contudo, no que diz respeito ao processo de apoptose, processo fisiológico importante na homeostase celular em organismos pluricelulares, estudos demonstram que os dados a cerca de possíveis alterações no processo de imunossenescência são ainda controversos. Dados obtidos por Aggarwal e colaboradores, 1998 (24) mostraram

que a expressão do Fas/FasL estava aumentada nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (tanto os *naive* quanto os de memória) em indivíduos idosos (65- 95 anos) quando comparados com os linfócitos de indivíduos jovens (20- 29 anos). Além disso, a expressão da molécula anti- apoptótica Bcl-2 encontrava-se diminuída. Já em estudo realizado em indivíduos centenários, a expressão do Fas em linfócitos de memória encontrava-se aumentada, enquanto a expressão do FasL estava diminuída (25).

No que tange a resposta imune humoral, há redução de células B, deficiência na troca de isótipos e diminuição da habilidade em produzir anticorpos específicos (23, 26). Adicionalmente, patógenos podem acelerar as alterações causadas pela imunossenescência e, neste contexto, infecções latentes por citomegalovírus (CMV) têm sido amplamente estudadas (27). A infecção latente por CMV ocasiona a formação de um repertório altamente antígeno-específico de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, capaz de reduzir o repertório de células T *naive* ao longo do tempo, fato que acarreta diminuição da capacidade de resposta aos novos estímulos antigênicos, podendo levar a uma maior taxa de mortalidade precoce. Em indivíduos idosos o comprometimento pode atingir até 50% do repertório de linfócitos T [CD4⁺ e CD8⁺] [28-30].

Segundo Rocha *et al.*, 1997(31), o conhecimento das bases celulares, moleculares e genéticas relacionadas com as alterações do sistema imune durante o envelhecimento permite seu entendimento, possibilitando retardar o início ou diminuir a gravidade da senilidade sobre o organismo, a fim de melhorar a qualidade de vida dos idosos. Neste sentido, tem-se intensificadas as investigações de terapias que possam amenizar as consequências da imunossenescência, como a prática do exercício físico (32). Este tem recebido atenção científica por sua eficácia, baixo custo, não ser invasivo e ser considerado de fácil execução. Além disto, estudos sugerem que a prática do exercício físico nos idosos está associada à redução da incidência e/ou gravidade de infecções (33).

De acordo com a literatura, quatro estudos compararam a proliferação de linfócitos em idosos praticantes de atividades físicas e idosos sedentários. Em três desses estudos, a proliferação induzida por mitógenos (fitohemaglutinina [PHA] e *Pokweed mitogen* [PWM]) apresentou-se maior nos idosos ativos, associando a maior atividade em pessoas idosas com a melhora na resposta imunológica (34-36).

Werner e colaboradores (37) verificaram que a prática do exercício físico possui efeito benéfico na prevenção da senescência celular em leucócitos circulantes e na parede vascular. Neste trabalho foram investigados os efeitos do exercício físico no telômero e apoptose na célula endotelial em camundongos, bem como os efeitos do treinamento de resistência a longo prazo sobre a biologia dos telômeros em seres humanos. Os resultados demonstraram aumento da atividade da telomerase aórtica, estabilização dos telômeros em camundongos, redução da apoptose endotelial e ativação da telomerase em células mononucleares e células isoladas da medula óssea (evidenciada pelo aumento da regulação da proteína TRF2 e expressão de mRNA). Para avaliação dos efeitos da atividade física nos telômeros humanos, atletas profissionais jovens e atletas de meia idade foram comparados com controles sedentários de idades similares. O comprimento do telômero apresentou-se reduzido nos leucócitos dos controles de meia idade e esta diminuição estava menor em atletas de meia idade (37). Estes dados sugerem que os efeitos benéficos do exercício físico sobre as proteínas dos telômeros e os fatores associados à senescência ocorrem nos leucócitos de atletas jovens. Nos atletas de meia idade com histórico de longo prazo contínuo de exercício foi encontrado um aumento da atividade da telomerase, além da conservação do comprimento dos telômeros. De acordo com Werner, esses achados podem melhorar a compreensão molecular dos efeitos benéficos da atividade física (37).

Além disso, dados da literatura (38, 39) mostram que maratonistas apresentam maior incidência de infecção das vias aéreas superiores, 3 a 72 horas, ou até duas semanas, pós-competição, mostrando que este tipo atividade física corresponde a um estresse supra fisiológico ocasionando uma disfunção do sistema imune. Diante deste fato, aventamos a hipótese de que em longo prazo este estresse fisiológico poderia trazer mais danos do que um possível retardo no envelhecimento do sistema imune (38, 39).

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, há poucos relatos na literatura sobre o papel da atividade física regular/crônica no padrão de secreção de citocinas, na resposta proliferativa e no encurtamento do telômero em subpopulações específicas da imunidade adaptativa, como T CD4⁺CD45RO⁺ (memória) T CD4⁺CD45RA⁺ (*naive*) ou T CD8⁺ CD28⁺ e CD28⁻, em indivíduos idosos. O questionamento atual é saber se o treinamento físico aeróbico intenso e regular em idosos é capaz de proteger/retardar ou não o processo de envelhecimento do sistema imunológico, uma vez que, atualmente, existem crescentes evidências favoráveis para esta prática, incluindo redução no risco de doenças infecciosas, e melhoras nos aspectos físicos e psicossociais (32). Por esta razão, foram escolhidos para participar do estudo, um grupo de indivíduos idosos (com idade entre 65 a 85 anos) que não praticam atividade física, em confronto com outro grupo de idosos que praticam atividade física intensa, com prática ≥ 5 anos contínuos, uma vez que acreditamos ser o tempo a longo prazo crucial para causar alterações no hábito de vida, permitindo a visualização de um possível impacto causado pela atividade física. Vale ressaltar que os indivíduos de ambos os grupos possuem auto percepção de saúde positiva, fato que pode ter influência no processo de envelhecimento saudável.

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

2- Objetivos

Avaliar em idosos saudáveis, em treinamento intenso de corrida há pelo menos cinco anos (TI), e em idosos saudáveis que não praticam atividade física (NT):

- a caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico;

- o comprimento do telômero, em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ CD45RO⁺ (memória) e T CD4⁺ CD45RO⁻ (*naive*) e subpopulações de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ e T CD8⁺ CD28⁻;

- a capacidade de resposta proliferativa dos linfócitos TCD4⁺ e linfócitos TCD8⁺ estimulados com antígenos e mitógenos;

- o perfil de produção de citocinas IL-2, IL-10, TNF- α e INF- γ de subpopulações de linfócitos T estimulados com antígenos e mitógenos;

- os níveis séricos de citocinas IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-10, TNF e IL-12p70, com a finalidade de caracterizar o estado subclínico “pró-inflamatório”;

- a expressão de marcadores de apoptose (caspase- 3 e Bcl2) em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (memória e *naive*) e subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (CD28⁺ e CD28⁻);

- a quantificação da resposta vacinal contra *Influenza* (ensaio de hemaglutinação).

3– Casuística e Métodos

3.1 Recrutamento da casuística:

Foram selecionados 41 indivíduos idosos (65-85 anos) do sexo masculino para fazer parte do estudo, sendo 16 não treinados (NT) e 25 com treinamento intenso (TI) (em treinamento para corrida realizada na distância oficial de 42,195 km - maratona, com prática de atividade física de pelo menos 5 anos), sendo parte da *Coorte de Atletas Seniores* em seguimento no ambulatório do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a coordenação do Prof. Luiz Eugênio Garcez Leme, e parte da Corpore Brasil (Associação sem fins lucrativos de corredores do estado de São Paulo).

Foram considerados critérios de exclusão aqueles indivíduos que apresentaram co-morbidades de impacto para o sistema imunológico (AIDS, mieloma, artrite reumatóide, diabetes não controlada, hipertensão não controlada etc.) e/ou que fizeram uso de medicamentos imunossupressores (ex. corticosteróides). Foram incluídos no estudo indivíduos portadores de co-morbidades e/ou em tratamento, porém sem repercussão significativa para o sistema imunológico (ex. hipertensão controlada, diabetes controlada, e/ou que fizeram uso de medicamentos antiinflamatórios 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 0135/11. Foram obtidos os consentimentos informados de todos os participantes do estudo.

3.2 Coleta e processamento das amostras

Foram coletados cerca de 100 mL de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo, em tubo estéril contendo heparina como anticoagulante. As amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (*PBMC – peripheral blood mononuclear cells*) através do método de gradiente de densidade utilizando Ficoll-Paque Plus (*GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, United Kingdom*). Para tanto, as amostras foram diluídas com solução salina isotônica (0,9% NaCl) em proporção 1:1, e o sangue total diluído foi cuidadosamente vertido pelas paredes do tubo sobre o *Ficoll-Paque* (cerca de 10mL), sem homogeneização do tubo. O tubo foi centrifugado a 500 x g durante 20 minutos a

19°C, com a utilização do freio – *brake 3 (Beckman Model J-6B centrifuge, USA)*. O anel de células mononucleares foi recolhido e as células lavadas em solução salina por duas vezes, removendo-se o sobrenadante após centrifugação em velocidade de 100 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas com 1 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%.

3.2.1 Caracterização fenotípica dos linfócitos TCD4+ e CD8+ no sangue periférico.

Realizamos a caracterização fenotípica dos linfócitos T CD4+ e T CD8+ em idosos dos grupos NT e TI por meio de marcação de células do sangue periférico. Para tanto, utilizamos 5 mL do mesmo em tubo contendo EDTA como anticoagulante (BD Biosciences, EUA) e prosseguimos com a marcação. Foi preparado 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. As amostras foram incubadas 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, USA) para lise das hemácias (incubado por 20 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz), e 500 µl da solução BD FACSFlow™ (BD Biosciences, EUA) em cada amostra, seguida de lavagem das células, por meio da centrifugação das 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. A figura 1

esquematiza a estratégia de *gate* utilizada para caracterizar o perfil fenotípico das subpopulações de interesse.

A)

B)

C)

Figura 1: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de fenotipagem *ex vivo*. Dados representam análise de linfócitos T CD4⁺ (CD45RO⁺ e CD45RO⁻) e CD8⁺ (CD28⁺ e CD28⁻). A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade, B) delimitação dos linfócitos T totais (CD3⁺), C) delimitação dos linfócitos TCD4⁺ (CD45RO⁺ e CD45RO⁻) e CD8⁺ (CD28⁺ e CD28⁻) e suas respectivas subpopulações: MC (memória central), naive, ME (memória efetora) e T_{emra} (Terminalmente diferenciadas).

3.2.2 Purificação celular de linfócitos TCD4⁺

A purificação de linfócitos foi realizada a fim de utilizarmos os produtos celulares especificamente para avaliação do comprimento do telômero. Sendo assim, a partir das PBMC's descritas no item 3.2, purificamos os linfócitos TCD4⁺ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD4 (CD4⁺ T *Cell Isolation Kit II human, Miltenyi Biotec*, Alemanha) de acordo com a instrução do fabricante. Resumidamente as células mononucleares foram marcadas indiretamente utilizando-se o coquetel Biotin na concentração de 10µl para cada 10⁷ células (composto por anticorpos monoclonais anti-CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ e *Glycophorin A*), incubadas por 10 minutos a 4-8°C e posteriormente marcadas com o Anti-Biotin na concentração de 20µl para cada 10⁷ células (composto por anti-anticorpos monoclonais conjugados com microesferas magnéticas). Após lavagem em centrifugação de 300 x g 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, United Kingdom*), considerando o grau mínimo de pureza acima de 90%. A figura 2 esquematiza a análise utilizada para avaliação da pureza celular pós-purificação dos linfócitos TCD4⁺.

Figura 2: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de purificação celular. Dados representam análise de linfócitos T CD4+. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade e linfócitos T totais (CD3+), B) delimitação dos linfócitos TCD4+ pré e pós-purificação.

3.2.2.1 Obtenção de linfócitos TCD45RO+ e CD45RO-

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 CD45 RO 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 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 foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (LTCD4⁺ CD45RO⁻), *naïve*, também foram recolhidas.

Os linfócitos TCD4⁺ de memória purificados foram marcados com os anticorpos de superfície anti-CD45RO-PeCy5 (*BD Biosciences, USA*) para análise da pureza, a qual foi realizada em citômetro de fluxo (LSRFORTESSA™ - BD), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico. A figura 3 esquematiza a análise utilizada para avaliação da pureza celular pós-purificação, das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ CD45RO⁺ e CD45RO⁻.

Fig. 3: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de purificação celular. Dados representam análise de linfócitos T CD4⁺ CD45RO⁺ e CD45RO⁻. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade e linfócitos T totais (CD3⁺); B) delimitação dos linfócitos TCD4⁺ CD45RO⁺/CD45RO⁻ pós- purificação.

3.2.3 Purificação celular de linfócitos TCD8⁺

A partir das PBMC's purificamos os linfócitos TCD8⁺ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD8 (CD8⁺ T Cell Isolation Kit human, Miltenyi Biotec, 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 anti-anticorpos monoclonais conjugados com microesferas magnéticas). Após lavagem em centrifugação de 300 x g por 10 minutos com solução tampão (PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA), as células foram acondicionadas em coluna magnética (LD, *Miltenye Biotec*, Alemanha), ocorrendo a depleção das células magneticamente marcadas. A pureza destas células foi avaliada empregando-se citometria de fluxo com três cores (CD3/CD4/CD8; *Serotec, Oxford, United Kingdom*), considerando o grau mínimo de pureza acima de 90%. A figura 4 esquematiza a análise utilizada para avaliação da pureza celular pós-purificação, das subpopulações de linfócitos TCD8+.

Fig. 4: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de purificação celular. Dados representam análise de linfócitos T CD8+. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade e linfócitos T totais (CD3+), B) delimitação dos linfócitos TCD8+ pré e pós-purificação.

3.2.3.1 Obtenção de linfócitos T CD8+CD28+ e T CD8+CD28-

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. Neste procedimento, as células CD28⁺ foram marcadas com CD28 PE na concentração de 10 μ l para cada 10⁷ células. Posteriormente, as células foram marcadas com microesferas anti-PE na concentração de 20 μ l 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 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 (T CD8⁺ CD28⁺) foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (T CD8⁺ CD28⁻), também foram recolhidas.

Os linfócitos T CD8⁺ CD28 purificados foram marcados com os anticorpos de superfície anti-CD28-PECy5 (*BD Biosciences*, *USA*) para análise da pureza, a qual foi realizada em citômetro de fluxo (LSRFORTESSA™ - BD), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico. A figura 5 esquematiza a análise utilizada para avaliação da pureza celular pós-purificação, das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ e CD28⁻.

Figura 5: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de purificação celular. Dados representam análise de linfócitos T CD8+ CD28+ e CD28-. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade e linfócitos T totais (CD3+); B) delimitação dos linfócitos T CD8+ CD28+ e CD28- pós- purificação.

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

A metodologia de *FISH* para a determinação do comprimento dos telômero de células foi previamente descrita e empregada por Rufer *et al.*, em 1998 (40). A hibridação *in situ* por fluorescência (*FISH*) foi realizada com o emprego do *Telomere*

PNA Kit/FITC (DAKO, CO, Reino Unido) de acordo com a instrução do fabricante. Resumidamente os linfócitos obtidos após purificação celular foram ressuspensos em uma solução de hibridização contendo 70% de formamida deionizada, 20 mM TRIS, pH 7, 1% de BSA e a *probe* (sonda) específica para o telômero FITC-PNA (C₃TA₂)₃. As amostras foram aquecidas a 80°C para denaturação, seguida de hibridação. Após este período, as células foram lavadas e incubadas *overnight*.

3.2.4.1 Identificação dos linfócitos e células 1301 após *Flow-FISH*

A determinação do comprimento dos telômeros, atribuída à metodologia de *Flow-FISH* foi realizada adicionando-se em todas as amostras contendo linfócitos, células de linhagem tumoral 1301 (Figura 6). Tais células são utilizadas como controle interno da técnica, uma vez que possuem telômeros longos e são tetraplóides. 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). Tais células são consideradas de fácil cultivo, fato que viabiliza a sua rápida expansão. Além disto, apresentam característica de formar aglomerados, uma vez que dependem do contato célula-célula para originar tecidos (característica do linfoma). Sendo assim, após a formação de um tapete celular visualizado no microscópio, realizamos o repique, trocando o meio em que estão submersas. Para formação de novas alíquotas, tais células são contadas e posteriormente congeladas em meio contendo SFB suplementado com 40% de RPMI e 10% de DMSO, acondicionadas em tubos de congelamento e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

Figura 6: Cultivo de células de linhagem 1301. Aumento de 100, 200 e 400X.

Nos experimentos realizados, utilizamos 10^6 linfócitos T CD8+ (CD28+ e CD28-) ou T CD4+ (CD45RO+ e CD45RO-) purificados e adicionamos na mesma amostra 10^6 células 1301. O volume final de cada alíquota foi dividido em dois tubos *ependorf*, caracterizando assim a amostra com e sem a marcação para a probe do telômero (PNA-FITC) e posteriormente as amostras foram marcadas com Iodeto de Propídeo - PI para identificação da fase $G_{0/1}$ do ciclo celular. Após a hibridação, realizamos a aquisição dos dados em citômetro de fluxo (LSRFORTESSA™ - BD) com posterior análise por meio do *Software FlowJo* versão 7.6.4.

Um exemplo do resultado da análise do comprimento do telômero em linfócitos TCD8+ utilizando a metodologia de Flow FISH pode ser verificado na fig. 7 (*Telomere PNA Kit/FITC* - DAKO, CO, Reino Unido). A visualização inicial das células se dá por meio do *dot plot* tamanho (FSC) no eixo da abscissa e granulosidade (SSC) no eixo da ordenada. O *dot plot* seguinte representa PI no eixo da abscissa, correspondente à marcação do DNA em escala linear e FITC no eixo na ordenada, representando o sinal fluorescente da sonda PNA telomérica, em escala logarítmica. A fase $G_{0/1}$ do ciclo celular foi delimitada para cada tipo celular, representando cópia única do genoma. Na sequência, foram plotados histogramas unidimensionais para os L TCD8+ e células 1301, em escala logarítmica com FITC na abscissa e número de células na ordenada, para determinação do MFI resultantes da marcação com e sem sonda telomérica, que foram utilizados no cálculo para medir o comprimento do telômero.

Figura 7: 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 G_{0/1} (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).

O cálculo do comprimento relativo do telômero (RTL) foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Sendo assim:

$$(\text{Mean FL1 sample cells with probe} - \text{mean FL1 sample cells without probe}) \times \text{DNA index of control cells} \times 100$$

RTL = _____

$$(\text{Mean FL1 control cells with probe} - \text{mean FL1 control cells without probe}) \times \text{DNA index of sample cells}$$

Substituindo os valores, temos:

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

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). Por fim, os dados obtidos em porcentual foram convertidos em Kbp, uma vez que as células 1301 apresentam um comprimento de telômero conhecido, de 23,48 Kbp (41).

3.2.5 Cultura de PBMC

A suspensão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtida através de gradiente de Ficol-Hypaque de sangue periférico heparinizado foi cultivada em placas de 24 alvéolos (Costar, USA), totalizando 3×10^6 células em volume final de 1mL por alvéolo em meio RPMI 1640, enriquecido a 10% de soro AB humano (*Sigma, Steinheim, Alemanha*), e suplementado de gentamicina (10 µg/mL, Novafarma, SP, BR). Estas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ por períodos de seis dias. Estímulos de Fitohemaglutinina (PHA, 2,5 µg/mL; *Gibco BRL, NY, USA*), e lisado total de citomegalovírus (CMV, 400ng/mL; doado pelo laboratório de virologia do IMT - USP) foram adicionados aos alvéolos. Coletamos as células 72 horas após a incubação com PHA e 144 horas após a incubação com CMV.

3.2.6 Avaliação da proliferação celular

Um marcador que vem sendo utilizado com frequência para indicar a proliferação celular é o antígeno Ki67, uma proteína nuclear que desempenha um papel na regulação de divisão celular. Dados da literatura sugerem que a expressão intracelular de Ki67 fornece uma medida específica, quantitativa e reproduzível da proliferação de células T específicas. Esta proteína é expressa em todas as fases ativas da divisão celular, estando ausente em células quiescentes e durante o reparo do DNA.

Dados da literatura sugerem que o Ki67 parece ser um marcador sensível para a detecção de respostas em pequenas subpopulações de linfócitos, podendo refletir o grau de proliferação *in vitro* em um antígeno-específico de forma mais precisa do que outras metodologias comumente utilizadas, tais como análogos da timidina e CFSE (42). A grande vantagem da proliferação celular com Ki67 é permitir a diferenciação de subpopulações celulares, não requerer etapas de incubação ou lavagem antes ou durante a cultura, que porventura poderia acarretar em perda do número de células, e não haver manuseio a compostos tóxicos. Entretanto, uma limitação deste ensaio é a sua incapacidade para identificar o número de ciclos de proliferação celular, como pode ser feito com os ensaios de diluição com corante. Tendo em vista que identificar os ciclos de proliferação celular não é o objeto do nosso estudo, e sim avaliar a capacidade de proliferação frente a estímulos específicos e inespecíficos, o uso do Ki67 tornou-se oportuno para esta finalidade.

Sendo assim, realizamos a marcação para análise da linfoproliferação utilizando Ki67 nas subpopulação de células TCD4⁺ *naive* e de memória e TCD8⁺CD28⁺ e TCD28⁻ estimuladas com antígeno (CMV) e mitógeno (PHA). Esta se deu por meio do kit comercial de fixação e permeabilização BD Cytofix/Cytoperm™ (Cat. Nº 554714, *BD Biosciences*, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para tanto, as células foram coletadas e transferidas em tubos *ependorfs* de 1,5 ml, centrifugadas a 250 xg (Hermle Z200 M/H, Alemanha) e o sobrenadante desprezado. Feito isso, ressuspendemos as células com 100 µl de PBS contendo 0,1µl do marcador Live/Dead® (Fixable Red Dead Cell stain kit Cat nº L23102, Invitrogen™, Life Technologies, USA), incubando ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30 minutos. Ao término do período de incubação as células foram lavadas duas vezes com tampão de marcação (PBS, um por cento de soro fetal bovino, 0,09% de azida sódica, filtrado com pH entre 7,4 – 7,6) centrifugando a 250 xg (Hermle Z200 M/H, Alemanha). Foram adicionadas às células 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), sendo posteriormente incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas duas vezes,

novamente, e ressuspensas com 250 µl da solução BD Fixation/Permeabilization™ (*BD Biosciences*, EUA), incubadas ao abrigo da luz a 4°C por 20 minutos e lavadas duas vezes com BD Perm/Wash™ (*BD Biosciences*, EUA) centrifugando a 250 xg. 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 de anticorpo monoclonal 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 xg por cinco minutos a temperatura ambiente. As células foram ressuspensas em tampão de marcação e para formaldeído 1%. A aquisição dos dados foi realizada por citometria de fluxo (citômetro LSRFortessa™ - *BD Biosciences*, EUA) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 7.6.4.

A figura 8 esquematiza a estratégia de *gate* utilizada para delimitação das subpopulações de interesse por citometria de fluxo, para linfoproliferação.

Figura 8: Estratégia de *gate* utilizada para todos os ensaios de linfoproliferação. Dados representam análise de LTCD4⁺ CD45RO⁺. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade, B) delimitação de células viáveis, C) *gate* em linfócitos TCD3⁺, D) *gate*

em LTCD4+, E) *gate* em CD45RO+, F) proliferação de células não estimuladas, G) proliferação de células estimuladas com PHA, H) proliferação de células estimuladas com CMV.

3.2.7 Dosagem de citocinas

3.2.7.1 Em sobrenadantes de cultura

Após a cultura de PBMC's descrita no item 3.2.5, realizamos a coleta dos sobrenadantes com 24 horas para dosagem de IL-2 e TNF- α e 120 horas de cultivo para as citocinas IL-10 e INF, Os sobrenadantes foram coletados, 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. Esta foi realizada por meio do kit Human Th1/Th2 Cytometric Bead Array (CBA) [Cat nº 551809 - BD Biosciences, EUA], seguindo o procedimento descrito pelo fabricante. Vale ressaltar que a aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA).

3.2.7.2 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. 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. A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA).

3.2.8 Expressão de marcadores de apoptose *in vitro*

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⁻) sem estimulação e após estimulação com PHA. Sendo assim, após a cultura de PBMC, as células foram marcadas conforme descrito no item 3.2.6., 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 meio de citometria de fluxo, com o citômetro LSRFortessa™ (BD Biosciences, EUA) com os dados analisados através do Software FlowJo versão 7.6.4.

A Fig 9 esquematiza a estratégia de *gate* utilizada para delimitação das subpopulações de interesse por citometria de fluxo. Vale ressaltar que em todos os ensaios realizamos a análise baseada nas células viáveis (Live/Dead).

A)

B)

C)

D)

E)

BASAL

PHA

Figura 9: Estratégia de *gate* utilizada para os ensaios de apoptose. Dados representam análise de LTCD4⁺ CD45RO⁺. A mesma análise ocorreu para células T CD8⁺ CD28⁺/CD28⁻. A) delimitação dos linfócitos de acordo com tamanho e granulosidade, B) delimitação de células viáveis, C) *gate* em linfócitos TCD3⁺, D) *gate* em LTCD4⁺, E) *gate* em células CD45RO⁺ e CD45RO⁻, seguidas da expressão de caspase-3 (Q1) e Bcl-2 (Q3) nas condições basais e com estímulo PHA.

3.2.9 Quantificação da resposta vacinal contra *Influenza*

Para avaliação da cinética de produção e queda dos títulos de anticorpos anti-*Influenza*, realizamos a coleta do soro nos indivíduos idosos pertencentes ao grupo NT (n=15) e no grupo TI (n=18), durante as campanhas nacionais contra a gripe realizadas em 2012 e 2013. Tal coleta se deu em três períodos distintos: antes da vacinação, 6 semanas (pico da resposta anticórpica) e 6 meses pós-vacinação (queda da resposta anticórpica). A determinação do título de anticorpo foi realizada pela técnica de Inibição de Hemaglutinação no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) em colaboração com a Dra Clarice Machado e a pesquisadora Lucy Vilas Boas. Os subtipos utilizados neste ensaio foram H1N1, H3N2 e *Influenza* B.

4- Análise Estatística

O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado no confronto entre os grupos NT e TI (inter-grupo), e o *Paired test* em confronto intra-grupo. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado o software *GraphPad Prisma 5.0* (*GraphPad Software Inc.*, San Diego, CA, EUA). Na avaliação da resposta vacinal, para as análises intra-grupo, o teste estatístico utilizado para os três períodos foi ANOVA (*Newman-Keuls Multiple Comparison Test*) e nas análises inter-grupo, o teste estatístico utilizado foi *t test* (*Unpaired t test with Welch's correction*). A apresentação gráfica se deu em média geométrica e para as análises, transformamos os valores dos títulos de anticorpos em $\log_2$.

5- Resultados

5.1 Parâmetros demográficos antropométricos e laboratoriais

Conforme descrito no item 3.1, realizamos o recrutamento da casuística e separamos os indivíduos de acordo com a prática ou não de atividade física, sendo estes classificados em NT e TI. Ambos os grupos apresentaram auto-percepção de saúde positiva e eram ativos, ou seja, desempenhavam suas atividades cotidianas sem dificuldades, apesar do grupo NT não realizar exercícios físicos. O grupo TI apresentou uma média de tempo de prática de atividade de 25,8 anos e a média da frequência de treinamento intenso (corrida) foi superior a 5 vezes na semana (total >50 km/semana). Ambos os grupos tiveram sua condição clínica atual avaliada pela Dra Manuella de Souza Toledo (médica geriatra e pós graduanda do IOT-FMUSP) através de exame clínico, avaliação geriátrica global (AGA) e parâmetros laboratoriais básicos (função renal e hepática, hematimetria, eletrólitos e hormonais e sorologia anti-CMV), realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas. A AGA foi realizada com a aplicação dos questionários: Versão Brasileira do Questionário de Qualidade de Vida - SF-36, um dos instrumentos mais utilizados para avaliar a qualidade de vida, aplicado em mais de 40 países e validado no Brasil (43); avaliação cognitiva (Mini-Exame do Estado Mental [MEEN]), sendo o teste mais utilizado para avaliar a função cognitiva, por meio da avaliação de vários domínios (orientação espacial, temporal, memória imediata e de evocação, cálculo, linguagem-nomeação, repetição, compreensão, escrita e cópia de desenho), também validado no Brasil (44); depressão; condição nutricional (MAN), desenvolvido para avaliar o risco de desnutrição em idosos e identificar aqueles que possam se beneficiar de intervenção precoce, além de ser um método validado e considerado padrão ouro, por ser prático, não invasivo, de simples mensurações e de questões rápidas (45). Vale ressaltar que o histórico de cada indivíduo foi minuciosamente coletado pelos pesquisadores participantes do projeto de pesquisa, como por exemplo, a presença ou ausência da prática de atividade física, bem como o tipo de treinamento, duração e intensidade.

Os dados demográficos e antropométricos estão descritos na tabela 1. Podemos observar que ambos os grupos apresentaram equivalência em relação à idade e, conforme o esperado o IMC dos indivíduos TI foi inferior ao grupo NT ($p=0.01$). Ambos os grupos não apresentaram risco de desnutrição e, de acordo com a pontuação obtida pelo MEEM, nenhum dos indivíduos idosos de ambos os grupos apresentou

perda cognitiva, um dado que clinicamente poderia ser um indicativo de demência ou depressão.

Tabela 1: Dados dos grupos de estudo

	NT	TI
	<i>n</i> = 16	<i>n</i> = 25
Idade anos	69.5 (68 - 77.8)	72 (68 - 77)
IMC	25.6 (22.9 - 27.8)	23.1* (22.1 – 24.1)
MAN	25 (23 - 26.5)	26.5 (25- 28)
MEEN	27 (24 - 28)	28 (26,7 - 29)

Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75). MAN: sem desnutrição 24 pontos; risco de desnutrição 23.5 – 17 pontos; desnutrição < 17 pontos. MEEN: Intacta 25 – 30 pontos; Leve 21 – 24 pontos; Moderada 10 – 20 pontos; Grave ≤ 9 pontos. * $p=.01$

No que diz respeito à avaliação dos aspectos da qualidade de vida, atribuído ao questionário SF-36, a análise evidenciou que ambos os grupos de estudos apresentaram equivalência nos oito parâmetros abordados, variando entre muito bom a excelente (tabela 2). Vale destacar que no item “Limitação Física”, embora não se observe diferença estatística entre os grupos, a classificação do grupo TI é “Muito bom”, contra ‘Excelente’ do grupo NT. Isso pode revelar problemas esporádicos e lesões devido ao alto impacto causado pela atividade física, uma vez que o risco de contusões nos atletas é maior.

Tabela 2: Dados do SF36

	NT <i>n</i> = 16	TI <i>n</i> = 25
Capacidade Funcional	85 75 – 95	95 87,5 - 100
Limitação Física	100 50 – 100	75 62,5 - 100
Dor	79 56,25 – 100	100 62 - 100
Estado Geral Saúde	77 68,25 – 87	81 65,5 - 99,25
Vitalidade	75 62,5 – 90	80 67,5 – 87,5
Aspectos Sociais	93,75 62,5 – 100	100 70,25 – 100
Aspectos Emocionais	100 33 – 100	100 50 – 100
Saúde Mental	80 69 - 95	80 69 – 95

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

A avaliação dos parâmetros laboratoriais básicos dos indivíduos idosos de ambos os grupos mostram que suas funções hepáticas, renais, endócrinas e metabólicas encontram-se dentro da normalidade para a faixa etária (Tabela 3). Além disso, a análise dos resultados laboratoriais evidenciou que 25% dos indivíduos do grupo NT apresentam hipertensão arterial sistêmica controlada (HAS), 12,5% apresentam diabetes mellitus tipo II (DM) e 12,5% apresentava hipotireoidismo. Nos indivíduos do grupo TI, 20% apresentaram HAS controlada. Nenhum indivíduo fez uso de medicamentos imunossupressores (ex. corticosteróides). Nenhum idoso recrutado era tabagista ou alcoolista.

Tabela 3: Dados de investigação laboratorial

	NT <i>n</i> = 16	TI <i>n</i> = 25
Glicemia	96	87
acima de 60 anos: 80 - 115 mg/dL	(73 - 122)	(79,5 – 98,5)
Hemograma		
hemoglobina 13 - 18 g/dL	14,65 (14,25 - 15,9)	14,4 (14 - 15,4)
leucócitos 4 - 11 mil/mm ³	6,3 (5,5 - 6,9)	5,5 (4,5 – 6,1)
Enzimas Hepáticas		
ALP < 41 U/L	20,5 (15,5 -25,25)	25 (22,5 - 30,5)
FA 40 - 129 U/L	57 (48 - 67,5)	63 (49 - 72)
ALO < 37 U/L	21 (16,75 - 23,5)	22 (17- 29)
GAMA GT 8 - 61 U/L	20 (18 - 30,25)	26 (23 – 40,5)
Função renal		
creatinina 0,7 - 1,20	0,98 (0,89 - 1,0)	0,95 (0,87 - 1,1)
uréia 10 - 50 mg/dL	36 (31 - 43)	36,5 (33 - 44,5)
Hormônios		
TSH 0,27 - 4,2 UI/ml	2,9 (1,35 - 4,47)	1,71 (1,36 - 2,87)
T4 livre 0,93 - 1,70 ng/dL	1,2 (1,0 - 1,35)	1,09 (1 - 1,25)
PTH 16 - 87 pg/mL	43 (20,25 - 61)	56,5 (32,25 – 85,5)
Testosterona livre 131 - 640 pmol/L	198 (172 - 293)	270 (189 – 412,5)
Colesterol – LDL		
Sem risco: inferior a 130 mg/dL	113	100
Risco moderado: 130 a 159 mg/dL	(93 - 131)	(83,25 – 122,8)
Risco elevado: superior a 159 mg/dL		
Triglicérides		
Desejável: inferior a 150 mg/dL	87	76
Limítrofe: 150 a 200 mg/dL	(63 - 183)	(71 - 108)
Elevado: 200 a 499 mg/dL		
Alto risco: superior a 500 mg/dL		

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.

5.1.1 Determinação do nível de atividade física

A determinação do nível de atividade física dos indivíduos participantes do estudo se deu por meio do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ – versão longa). Ao término das entrevistas para aplicação do IPAQ, a obtenção do cálculo dos escores de atividade física foi realizada de acordo com os procedimentos descritos nas Diretrizes para Processamento e Análise de Dados do IPAQ (*Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire*, disponível em: www.celafiscs.org.br), expressando-se o resultado em MET-minutos/semana. MET, medição do consumo de energia, equivale ao índice metabólico basal de uma pessoa em repouso. Presume-se que seja igual a uma captação de oxigênio de 3 mL por kg de peso corporal por minuto, ou aproximadamente 1 kcal por kg de peso corporal por hora (33).

Apesar de termos aplicado o IPAQ versão longa, optamos por utilizar os MET's obtidos na seção 4- atividades físicas de recreação, esporte, exercício e de lazer, uma vez que estudo realizado por Abu-Omar & Rütten, 2008(46), demonstrou que somente as atividades físicas realizadas como lazer possuíam associação com indicadores de saúde. Além disso, Hallal e colaboradores (2010) em um levantamento de dados após dez anos do emprego do IPAQ no Brasil, concluiu que a seção de lazer do IPAQ é recomendada em estudos que visam determinar o nível de atividade física (47).

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 (NT). Os indivíduos idosos que apresentaram uma pontuação superior a 3000 MET-min/semana foram considerados “high intensity” (TI). A comparação da pontuação obtida com o IPAQ mostra a diferença ($p < 0,0001$) do gasto calórico semanal entre os indivíduos idosos estudados (Figura 10).

Figura 10: Pontuação do IPAQ. Os indivíduos idosos NT apresentam um gasto calórico semanal menor que os indivíduos idosos TI. Cada símbolo representa um indivíduo idoso. O traço representa a mediana. Mann Whitney test.

Contudo, estudos sobre a medida da atividade física em pessoas idosas são particularmente difíceis devido à escassez de instrumentos válidos e razoavelmente consistentes. A utilização de questionários para medir o nível de atividade física é especialmente problemática devido à imprecisão das informações fornecidas e a susceptibilidade a viés de registro ou memória. Sendo assim, para confirmar a divisão dos grupos feita de acordo com o IPAQ, os indivíduos foram submetidos ao teste ergoespirométrico. Esse teste permite a determinação do consumo máximo de oxigênio ($VO_2\text{máx}$), e é considerado um padrão “*gold standard*” para a medida do limite funcional do sistema cardiorrespiratório, sendo muito utilizado na classificação e triagem de atletas (48). Os testes foram realizados pelo fisiologista Dr. Paulo Roberto Silva no Laboratório do Estudo do Movimento no IOT- Centro de Excelência reconhecido pela FIFA, utilizando o teste de Heck modificado.

Por não existirem valores de referência para os grupos que estudamos, optamos por utilizar uma relação entre o valor obtido do $VO_2\text{máx}$ pelo valor do predito. Para tanto, utilizamos uma equação de predição desenvolvida por Blackie e colaboradores (1989) (49) [Fig. 11 A] na qual foram avaliados indivíduos com idade superior a 55 anos, uma vez que a idade é um fator que influencia o valor do $VO_2\text{máx}$. Estima-se que o $VO_2\text{máx}$ diminua 1% ao ano a partir da terceira década de vida (50). Porém a relação mostrou que alguns indivíduos sedentários ficaram abaixo de 70% do predito, o que indica uma deficiência cardiorrespiratória, o que não foi constatado nem na avaliação

geriátrica e nem no teste ergoespirométrico. Optamos por utilizar a equação desenvolvida por Neder e colaboradores (1999) que além de avaliar indivíduos idosos (61 – 80 anos), utilizaram também indivíduos sedentários sadios (51). O item B da Fig. 11 mostra a representação gráfica da relação, indicando um “overlap” entre os grupos.

Como a taxa de gordura influencia o valor do $VO_{2máx}$, ou seja, quanto maior a taxa de gordura do indivíduo menor seu $VO_{2máx}$, decidimos dividir o valor de $VO_{2máx}$ obtido no teste pelo peso do indivíduo. O item C da Fig. 11 mostra que houve uma redução parcial do “overlap” verificado quando aplicamos a equação de Neder. Acreditamos que a permanência do “overlap” se deva a fatores genéticos, pois estes determinam em até 50% o valor do $VO_{2máx}$ (50). Desta forma, como critério final para confirmarmos a divisão dos grupos, utilizamos um grupo de indivíduos idosos, participantes de outro protocolo de pesquisa do nosso grupo, que praticam atividade física aeróbica moderada e regular, TM, em treinamento para participação de provas de até 10.000 metros. Verificamos que os idosos TI de nosso estudo realmente possuem uma atividade física de alto desempenho, confirmando a divisão dos grupos. Desta forma, diferentes históricos de atividade física dos dois grupos correspondem a distintos valores de $VO_{2máx}$ e METs.

A) $Vo_2 \text{ max}$ predito - Equação Blackie

B)

$Vo_2 \text{ max}$ predito - Equação Neder

C)

$VO_2 \text{ max}$ - representação ml/kg/min

Figura 11: Dados do teste ergoespiométrico. Os dados do $\text{VO}_2 \text{ máx}$ confirmaram a divisão dos indivíduos idosos entre NT e TI. *Mann Whitney test* (* $p=.001$, ** $p=.0005$, *** $p=.0001$).

5.2 Parâmetros imunológicos

Os ensaios imunológicos já descritos foram realizados nos indivíduos recrutados para o estudo, que tiveram disponibilidade para comparecer nas coletas de sangue. Sendo assim, todos os parâmetros imunológicos foram determinados em 15 indivíduos idosos do grupo NT e 15 indivíduos idosos do grupo TI. Vale ressaltar que as coletas de sangue periférico e soro dos indivíduos idosos do grupo TI foram realizadas no mínimo 48 horas após realização de treinamento habitual e não na semana de provas, respeitando-se o tempo de recuperação destes indivíduos e permitindo que o número de linfócitos circulantes retorne aos valores basais (52).

5.2.1 Caracterização fenotípica dos linfócitos TCD4+ e CD8+ no sangue periférico

Sabe-se que uma das principais consequências da imunossenescência é o declínio do número de células T com fenótipo *naive* (53, 54) e aumento de células T de memória efetora (55). Um dos mecanismos relacionados a este processo é a involução tímica e a capacidade reduzida de geração de progenitores linfóides devido à redução da funcionalidade das células tronco hematopoiéticas. Tendo em vista que a alteração fenotípica é um efeito da imunossenescência, analisamos a composição celular nos indivíduos participantes do estudo, com o intuito de verificar se a modalidade de atividade física estudada possui algum efeito neste compartimento.

Ao analisarmos a composição celular dos indivíduos idosos participantes do estudo, verificamos que ambos os grupos apresentaram percentual de linfócitos T e suas subpopulações CD4+ e CD8+ dentro da faixa de normalidade (Tabela 4).

Tabela 4: Subpopulações de linfócitos T do sangue periférico

	NT	TI	
	(n=15)	(n=15)	Valores de referência*
% CD3⁺	63,9**	66,0	60 - 87
	(56,1 – 72,9)	(53,8 – 78,1)	
% CD3⁺CD4⁺	33,8	37,8	32 - 61
	(29,4 – 40,3)	(30,8 – 44,5)	
%CD3⁺CD8⁺	17,0	18,0	14 - 43
	(12,8 – 29,2)	(14,5 – 22)	

* Valores de referência retirados da referência 52. ** Dados apresentados em medianas e percentis (25 – 75).

Durante o envelhecimento um conjunto de parâmetros imunológicos está associado à disfunção imune, tais como o acúmulo de linfócitos T CD28-, a inversão da relação CD4/CD8, soropositividade para CMV, dentre outros que compõem o chamado Perfil de Risco Imunológico, considerado um preditor de fragilidade, aceito como fator patogênico no desenvolvimento de diversas doenças (56).

Em nosso estudo, 93,3% dos idosos NT e TI (14/15) apresentaram sorologia positiva para CMV. A análise individual demonstrou que 20% dos idosos NT e TI (3/15) apresentaram relação CD4⁺/ CD8⁺ menor que um. Porém, a comparação intragrupo das subpopulações de linfócitos T mostrou que em ambos os grupos de estudo a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ foi maior que a de linfócitos T CD8⁺, não havendo diferença estatística nas porcentagens de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na análise intergrupos (Figura 12).

A)

B)

Figura 12: A) Análise das subpopulações T CD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico. Coluna branca, idosos NT ($n = 15$), coluna cinza, idosos TI ($n = 15$). B) Relação CD4:CD8. NT = idosos sem treinamento, TI= idosos treinados intensamente. Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

A análise da distribuição das células *naïve* (CCR7+CD45RA⁺), memória central (MC = CCR7+CD45RA⁻), memória efetora (ME = CCR7-CD45RA⁻) e memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA} = CCR7-CD45RA⁺) para os linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺, demonstrou que houve o predomínio de células MC, tanto nos linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺, em ambos os grupos, seguida pelas células *naïve*, ME e T_{EMRA} (figura 8). A comparação de frequências destas células entre os grupos revelou que os idosos TI apresentaram uma maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ ME

(mediana de 20,7% TI e 18,5% NT, $p = 0,0487$) e uma menor porcentagem de linfócitos T CD4⁺ T_{EMRA} (mediana de 1,6% TI e 3,74% NT, $p = 0,0011$), quando comparados ao grupo de idosos NT, sendo que as porcentagens de linfócitos T CD4⁺ *naive* e ME, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 13).

Figura 13. A análise da distribuição das células naive (CCR7+CD45RA+), memória central (MC= CCR7+CD45RA-), memória efetora (ME= CCR7-CD45RA-) e terminalmente diferenciada (T_{EMRA} = CCR7-CD45RA+) nos linfócitos TCD4⁺. NT = idosos sem treinamento, TI= idosos treinados intensamente. n NT = 15, n TI =15. Para LTCD4⁺. Dados apresentados em mediana.

Na subpopulação de linfócitos TCD8⁺, a comparação de frequências destas células entre os grupos revelou o mesmo padrão: idosos TI apresentaram maior porcentagem de linfócitos TCD8⁺ ME (mediana de 23,2% TI e 13,6% NT, $p = 0,031$) e menor porcentagem de linfócitos TCD8⁺ T_{EMRA} (mediana de 4,6% TI e 11,1% NT, $p = 0,0025$), quando comparados ao grupo de idosos NT, sendo que as porcentagens de linfócitos TCD8⁺ *naive* e ME, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 14).

Figura 14. A análise da distribuição das células naive ($CCR7+CD45RA+$), memória central ($MC= CCR7+CD45RA-$), memória efetora ($ME= CCR7-CD45RA-$) e terminalmente diferenciada ($T_{EMRA} = CCR7-CD45RA+$) nos linfócitos TCD8+. NT = idosos sem treinamento, TI= idosos treinados intensamente. n NT = 15, n TI =16. Dados apresentados em mediana.

Dentre as alterações fenotípicas oriundas do processo de envelhecimento, tem-se a perda da expressão da importante molécula coestimulatória CD28 (membro da família TNF que interage com CD80 e/ ou CD86 na superfície das APCs) [29], fato que compromete a funcionalidade celular. As células que perdem a expressão desta molécula são ditas “senescentes”, já as demais, “não senescentes”. Devido ao importante papel desempenhado por esta molécula no desencadeamento das respostas imunológicas, estudamos a sua expressão nas subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+, para verificar o comportamento em cada grupo de estudo, bem como uma possível influência da modalidade de atividade física estudada nesta expressão.

Na subpopulação de linfócitos TCD8+, podemos observar que ambos os grupos apresentaram comportamento semelhantes, com prevalência no percentual de células

senescentes (CD28-). Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos e subpopulações (Figura 15).

Figura 15. Análise da distribuição das células CD28+ e CD28- nas subpopulações TCD8+ do sangue periférico. Coluna branca idosos NT ($n = 15$), coluna cinza idosos TI ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

No compartimento de células T CD4⁺, diferente do observado nos linfócitos T CD8+, verificamos predominância das células não senescentes (CD28+), em ambos os grupos, porém sem diferenças estatísticas. Isso indica que a perda desta molécula neste compartimento é um evento raro. Além disso, a análise intragrupo demonstrou que houve diferenças significantes entre as subpopulações (TI $p = .025$ e NT $p < 0.0001$), figura 16.

Figura 16. Análise da distribuição das células CD28⁺ e CD28⁻ nas subpopulações T CD4⁺ do sangue periférico. Coluna branca idosos NT ($n = 15$), coluna cinza idosos TI ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.2 Avaliação do comprimento do telômero em linfócitos do sangue periférico

Inicialmente, realizamos a análise do comprimento do telômero no compartimento total de linfócitos T CD3⁺ e os resultados evidenciaram que houve diferença estatística no grupo de indivíduos TI ($p=.013$), sugerindo um possível “mecanismo protetor” da modalidade de atividade física estudada nos idosos do grupo TI (Figura 17).

Figura 17. Determinação do comprimento do telômero em linfócitos TCD3⁺. Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75). * $p=.013$.

Com o intuito de verificar em quais subpopulações de linfócitos T estas diferenças são notórias, realizamos a análise nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e os resultados evidenciaram que, no compartimento de linfócitos T CD8⁺ os indivíduos idosos do grupo TI apresentaram mediana do comprimento do telômero superior a do grupo NT, $p = 0.0076$ (1,699 vs 1,491 Kpb). No compartimento de linfócitos T CD4⁺, apesar do grupo TI apresentar uma mediana superior à mediana do grupo NT (1,769 vs 1,655 Kpb), não houve diferença estatística (Figura 18).

Figura 18. Determinação do comprimento do telômero nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75). ** $p=.0076$.

Demos continuidade com as análises do comprimento do telômero em subpopulações específicas de linfócitos T CD4⁺ (CD45RO⁺ e CD45RO⁻) e T CD8⁺ (CD28⁺ e CD28⁻), dividindo as análises realizadas entre os indivíduos do mesmo grupo de estudo (análise intragrupo), bem como comparando os grupos estudados (análise intergrupo).

5.2.2.1 Análise intra grupo do comprimento do telômero

No compartimento de linfócitos TCD4⁺, os resultados evidenciaram que houve diferença estatística ($p<0.001$) entre as subpopulações de células T CD4⁺ CD45RO⁺ (mediana: 2.0 Kpb) e CD4⁺ CD45RO⁻ (mediana: 1.5 Kpb) dos indivíduos pertencentes ao grupo NT. Também houve diferença estatística entre o comprimento

do telômero no grupo de indivíduos TI ($p < 0.001$) (mediana $CD4^+ CD45RO^+$: 1.9; mediana $CD4^+ CD45RO^-$: 1.6) conforme fig.19. Isto demonstra como o esperado, que o comprimento do telômero das células T $CD4^+$ de memória é menor do que o das células $CD4^+$ *naive* dos mesmos indivíduos. De fato, os sucessivos ciclos replicativos a que as células de memória foram submetidas ao longo da vida resultaram no encurtamento do telômero (57,58).

Figura 19. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos $TCD4^+$ *naive* e de memória. A) Idosos não treinados, $n = 14$. B) idosos treinados intensamente, $n=15$. *Paired test*.

Ao realizarmos a análise intragrupo das subpopulações de linfócitos T CD8⁺, os resultados evidenciaram que, apesar da comparação entre as células T CD8⁺ CD28⁺ e T CD8⁺ CD28⁻ nos idosos NT ter sido significativa ($p = 0.01$), dois idosos apresentaram células CD28⁺ com telômeros menores que as células senescentes. Já nos indivíduos do grupo TI, observamos declínio do comprimento do telômero no compartimento que perdeu a expressão de CD28 ($p = 0.02$) (Fig. 20).

Figura 20. Determinação do comprimento do telômero nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescente e senescente. A) Idosos não treinados, $n = 14$. B) idosos treinados intensamente, $n=15$. Paired test.

5.2.2.2 Análise inter grupo do comprimento do telômero

Os dados obtidos da análise intergrupo nas subpopulações de linfócitos T CD4+, ambos os indivíduos dos grupos estudados apresentaram o mesmo comportamento. Porém, na subpopulação de linfócitos T CD8+, o grupo TI apresentou telômeros maiores que os NT, $p=0.0045$. (Figura 21).

A)

Figura 21. 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. Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Estes dados sugerem que a modalidade de atividade física estudada, representada pelos indivíduos do grupo TI, pode ter sido suficiente para ocasionar diferenças no comprimento do telômero nas subpopulações de linfócitos T CD8+ senescentes.

5.2.3 Avaliação da capacidade de resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺

Para avaliação da capacidade de resposta proliferativa dos linfócitos, utilizamos o mitógeno fitohemaglutinina (PHA), um estímulo inespecífico, e lisado-viral de CMV, um antígeno ubiquitário, ao qual a maior parte de nossa população de idosos já foi exposta, conforme verificado nos resultados da sorologia dos indivíduos participantes

deste estudo, no qual 93,7% dos idosos NT (14/15) e 93,3 % dos idosos TI (14/15) apresentam sorologia positiva para CMV, sendo que estes indivíduos foram incluídos nos ensaios envolvendo este antígeno.

Com relação à proliferação constitutiva (porcentagem de células em proliferação na ausência de um estímulo exógeno) observou-se que, conforme o esperado para células do sangue periférico de indivíduos “saudáveis”, esta porcentagem foi muito pequena em ambas as subpopulações de linfócitos estudadas (Fig. 22 e 23).

Após estimulação com PHA observou-se grande capacidade de resposta proliferativa nos linfócitos T $CD4^+ CD45RO^+$, decrescendo nos linfócitos T $CD4^+ CD45RO^-$, de forma similar nos dois grupos de idosos (Fig. 22), evidenciando preservação da capacidade funcional global de resposta destas subpopulações. Entretanto, a subpopulação *naive* nos indivíduos do grupo TI apresentou discreta, porém significativamente maior proliferação do que no grupo NT ($p = 0,034$).

Figura 22. Análise da capacidade linfoproliferativa frente à PHA nos subtipos de linfócitos T $CD4^+$ naive (RO^-) e de memória (RO^+). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

No compartimento de células T CD8⁺, conforme o esperado, podemos verificar uma baixa capacidade de resposta proliferativa constitutiva (basal), em ambas as subpopulações de linfócitos estudadas dos grupos NT e TI, uma vez que não há estímulo para que ocorra a replicação celular. Além disto, observamos vigorosa resposta proliferativa, em células CD28⁺ estimuladas com PHA, em ambos os grupos de estudo (Fig. 23). Outro dado interessante se relaciona com maior capacidade funcional da subpopulação que expressa CD28, em comparação com a subpopulação CD28⁻, após estimulação com PHA, demonstrando equivalência na porcentagem de células Ki67⁺ nos grupos de idosos NT e TI.

Figura 23: Análise da capacidade linfoproliferativa frente a PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺) e senescentes (CD28⁻). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos intensamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

Em relação à resposta linfoproliferativa ao CMV, conforme o esperado, a maior porcentagem de células Ki67⁺ foi detectada na subpopulação de ‘memória” (T CD4⁺ CD45RO⁺), com uma porcentagem de linfócitos respondedores ao CMV que variou de 0,2 a 1,4%, enquanto uma pequena parcela da resposta ao CMV foi detectada na subpopulação *naive* (T CD4⁺RO⁻) em ambos os grupos. Para as células TCD8⁺, tanto nas senescentes quanto nas não senescentes, a expressão de Ki67 foi praticamente inexistente, nos grupos NT e TI (Fig. 24), sendo a resposta observada, em ambos os grupos nos linfócitos T CD4⁺.

Figura 24 Análise da capacidade linfoproliferativa frente ao CMV nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ *naive* (RO⁻)/memória (RO⁺) e TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺)/senescentes (CD28⁻). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=14$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.4 Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura

No que diz respeito às células não estimuladas, ou seja, a resposta constitutiva, verificamos a detecção apenas da citocina IL-6, entretanto, com um valor próximo ao

limite mínimo de detecção (com mediana de 13,3 pg/mL nos idosos NT e de 6,59 pg/mL nos idosos TI). Por outro lado, após estímulo com PHA, em ambos os grupos, verificamos a produção de citocinas de ambos os padrões, com grande produção de IL-2 seguida por IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10, exceto a citocina IL-4 com uma produção muito próxima ao limite mínimo de detecção (mediana de 3,2 pg/mL nos idosos NT e de 1,5 pg/mL nos idosos TI). Já 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 (Figura 25).

Figura 25. Secreção de citocinas com padrão Th1 e Th2. Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.5 Dosagem de citocinas no soro

O estudo do Inflammaging é de grande importância na população de idosos, uma vez que este se caracteriza por inflamação de baixo grau sistêmico, porém crônico, relacionado a diversas patologias (57). Por esta razão, 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 5 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 zero. 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 estatística entre concentrações na comparação entre os grupos.

Tabela 5. Dosagens séricas de citocinas no soro dos idosos por CBA.

	NT <i>n</i> = 15	TI <i>n</i> = 15
IL-10	46,2 (23,5 – 98.8)	49.3 (34.8 – 91.1)
IFN-γ	0.0 (0.0 – 0.0)	0.0 (0.0 – 0.0)
IL-8	1184 (1046 – 1720)	1428 (970.7 – 1958)
IL- 1β	0.0 (0.0 – 0.0)	6.5 (0.0 – 19.05)
IL-12_{p70}	0.0 (0.0 – 23,55)	2.4 (0.0 – 12.8)
IL-6	245 (95.2 – 441)	308.5 (158 – 418)
TNF	0.0 (0.0 – 68,6)	4.5 (0.0 – 20.9)

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.

5.2.6 Avaliação da expressão de marcadores de apoptose em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

5.2.6.1 Expressão de Caspase-3 em linfócitos T CD4⁺ CD45RO⁺ vs CD4⁺ CD45RO⁻

Em relação à avaliação da apoptose, a análise da expressão da caspase-3 pelas subpopulações de linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ e CD45RO⁻ evidenciou, como esperado, que uma proporção significativa dos linfócitos em atividade mitogênica induzida pela PHA apresentava sinalização para apoptose, tanto nos indivíduos do

grupo NT (medianas: CD45RO+: 3.8%, CD45RO-: 5.2%) como nos indivíduos do grupo TI (CD45RO+: 4.3%, CD45RO-: 14.8%); estas diferenças não foram significativas (fig. 21). Nas subpopulações mantidas em repouso (3 dias) apesar de os índices de apoptose observados serem muito discretos (mediana $\leq 0.2\%$), verificamos, no grupo de idosos NT, maior expressão deste fator pró-apoptótico em ambas as subpopulações de linfócitos T CD4+, em comparação com idosos do grupo TI (CD45RO+: $p = 0.0041$; CD45RO-: $p = 0.0018$), figura 26.

Ao realizarmos uma comparação intra-grupo com relação à expressão de caspase-3 nas células T CD4+ estimuladas com PHA, verificamos que a subpopulação CD45RO- é mais suscetível a apoptose em idosos do grupo TI ($p = 0.0044$). Isto sugere que nestes idosos, a subpopulação de células de memória mantém preservados os mecanismos anti-apoptóticos, mesmo durante intensa proliferação celular, comparativamente às células CD45RO- (60). Em células não estimuladas não foram observadas diferenças significativas intra-grupo.

Figura 26. Análise da apoptose *in vitro*, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ *naive* (CD45RO⁻)/memória (CD45RO⁺). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.6.2 Expressão de Caspase-3 em linfócitos TCD8⁺ CD28⁺ vs. CD8⁺ CD28⁻

Também no compartimento de linfócitos T CD8⁺ observamos maior expressão de caspase-3 em ambas as subpopulações, CD28⁺ e CD28⁻, estimuladas com PHA, comparativamente à expressão na condição basal, tanto nos indivíduos do grupo NT (mediana: CD28⁺: 2.6%, CD28⁻: 5.9%) como nos indivíduos do grupo TI (CD28⁺: 1.5%, CD28⁻: 4.1%). Isto evidencia que ambos os grupos apresentam comportamento similar em relação à expressão da caspase-3. Este processo representa uma resposta funcional fisiológica, pois, assim como para os linfócitos TCD4⁺, a apoptose também sucede em muitas células durante a proliferação celular na subpopulação TCD8⁺ (figura 27). Não verificamos diferenças na expressão de caspase-3 de células estimuladas com PHA, entre os indivíduos dos grupos NT e TI. Entretanto, na ausência de estímulos, verificamos maior expressão de caspase-3 nos indivíduos pertencentes ao grupo NT, sugerindo uma possível ativação das vias apoptóticas destas células mesmo em estado basal (CD28⁺: $p = 0.0004$; CD28⁻: $p = 0.047$).

Ao realizarmos comparações intragrupo, verificamos que a expressão de caspase-3 após estímulo mitogênico foi maior nas células CD28⁻ do grupo NT, em relação a sua contrapartida CD28⁺ ($p = 0.0093$), indicando a susceptibilidade destas células senescentes a apoptose.

Figura 27. Análise da apoptose *in vitro*, expressão de caspase-3 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺ não senescentes (CD28⁺)/ senescentes (CD28⁻). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.6.3 Expressão de Bcl-2 em linfócitos TCD4⁺ CD45RO⁺ vs. CD4⁺ CD45RO⁻

No compartimento de linfócitos T CD4⁺, verificamos que nas células não estimuladas de ambas as subpopulações, houve maior expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 no grupo de idosos TI, em comparação com idosos NT (CD45RO⁺: $p=0.0038$; CD45RO⁻: $p=0.0038$). Esta observação, somada à redução da expressão de caspase-3 em células não estimuladas nos idosos TI indica uma manutenção dos mecanismos anti-apoptóticos neste subpopulação celular, implicando desta forma a prática de exercício físico regular de alta intensidade como um fator de proteção.

Nas células estimuladas com PHA observamos menores medianas de expressão de Bcl-2 nos NT; entretanto estas diferenças não foram estatisticamente significativas

No que tange a comparação intragrupo, em idosos do grupo TI observamos perda da expressão de Bcl-2 no compartimento de linfócitos TCD4⁺ CD45RO⁻ estimuladas com PHA, comparadas com as células de memória ($p < 0.0001$). Este fato condiz com o aumento da expressão de caspase-3 nas mesmas, sugerindo uma possível menor eficiência dos mecanismos anti-apoptóticos nestas células “naive” e preservação dos mecanismos anti-apoptóticos nas células de memória (figura 28).

Figura 28. Análise da apoptose *in vitro*, expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD4⁺ naive (RO⁻)/memória (RO⁺). Coluna branca idosos não treinados ($n = 14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.6.4 Expressão de Bcl-2 em linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ vs. CD8⁺ CD28⁻

No compartimento de linfócitos T CD8⁺, verificamos que nas células sem estímulo a porcentagem de expressão de Bcl-2 foi menor nos idosos do grupo NT que no grupo TI, condizente com o aumento da expressão de caspase-3 nas células dos idosos que não praticam atividade física (CD28⁺: $p = 0.0001$; CD28⁻: $p = 0.0006$). No entanto, após estimulação com PHA, a proporção foi similar entre os grupos, em ambas as subpopulações (Figura 24).

Por fim, a análise intra-grupo permitiu verificar menor expressão de Bcl-2 nas células CD28⁻ nos idosos do grupo TI, sugerindo que tais células são menos resistentes a apoptose que sua contrapartida CD28⁺, $p = 0.019$ (figura 29). Vale notar que esta diferença não se observou no grupo NT.

Figura 29. Análise da apoptose *in vitro*, expressão de Bcl-2 frente à estimulação com PHA nos subtipos de linfócitos TCD8⁺CD28⁺/CD28⁻. Coluna branca idosos não

treinados ($n=14$), coluna cinza idosos treinados intensamente ($n=15$). Dados apresentados em mediana e percentis (25 – 75).

5.2.7 Quantificação da resposta Vacinal anti-*Influenza*

Durante as campanhas nacionais contra a gripe realizadas em 2012 e 2013, realizamos a coleta do soro dos indivíduos idosos pertencentes ao grupo NT ($n= 15$) e TI ($n= 22$), em três períodos distintos: antes da vacinação, 6 semanas (pico da resposta anticórpica) e 6 meses pós-vacinação (queda da resposta anticórpica). Estes resultados nos parecem especialmente relevantes, pois, além dos dados *in vitro*, teremos dados *in vivo* da resposta imune dos indivíduos e poderemos avaliar a cinética de produção e queda dos títulos de anticorpos anti-*Influenza* (H1N1, H3N2 e Influenza B). A determinação do título de anticorpo foi realizada pela técnica de Inibição de Hemaglutinação no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) em colaboração com a Dra Clarice Machado e a pesquisadora Lucy Vilas Boas.

Inicialmente, com relação à análise do comportamento antigênico verificamos que a indução da resposta sorológica induzida pela vacinação contra a gripe demonstrou variações no potencial antigênico de cada subtipo, isto é, em todos os grupos de indivíduos idosos estudados os subtipos H3N2, seguido do H1N1 foram considerados altamente imunogênicos, em contrapartida, um comportamento distinto foi observado no subtipo *Influenza* B, o qual evidenciou baixa capacidade de resposta imunológica e títulos de anticorpos abaixo dos níveis considerados protetores (≤ 40), em ambos os grupos (figura 30).

A)

B)

Figura 30. Análise do comportamento antigênico das cepas H3N2, H1N1 e *Influenza B*. **A)** indivíduos pertencentes ao grupo NT (idosos não treinados; n = 15); **B)** indivíduos pertencentes ao grupo TI (idosos treinados intensamente; n = 22).

Dando sequência nas análises, podemos observar que, na cepa *Influenza B* (figura 31) os efeitos do exercício físico sobre o sistema imunológico são mais evidentes quando a vacina possui reduzida capacidade imunogênica. Sendo assim, a cinética da produção de anticorpos deste subtipo nos indivíduos dos grupos NT e TI, indicou que, no período pré-vacinação os títulos estavam igualmente baixos nos dois grupos, e abaixo do título mínimo considerado protetor (1:40). Em idosos NT, não houve aumento dos títulos após 6 semanas, nem mesmo após 24 semanas da vacinação. Em contraste, o grupo TI apresentou aumento significativo dos títulos após 6 semanas ($p < 0.0005$). Curiosamente, os títulos de anticorpos dos idosos diminuíram significativamente no grupo TI ($p < 0.0005$). Ao compararmos os grupos durante o período que antecede a vacinação não houve diferença entre eles, entretanto, seis semanas após a indução da resposta, os títulos foram significativamente maiores no grupo TI do que no grupo NT ($p = 0.0035$), indicando um possível papel adjuvante do treinamento intenso na melhora da resposta vacinal e esta comparação se reproduziu após 24 semanas ($p = 0.048$), apesar do limite de significância.

Figura 31. Cinética dos títulos de anticorpos anti-*Influenza* B. NT idosos não treinados, $n=15$. TI idosos treinados intensamente, $n = 22$. α pré vacinação vs seis semanas pós-vacinação ($p<0.0005$), β seis semanas pós-vacinação NT vs TI $p= 0.0035$, ∞ seis semanas pós-vacinação vs vinte e quatro semanas ($p<0.0005$), γ vinte e quatro semanas pós-vacinação NT vs TI $p= 0.0485$. Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

A curva de resposta do subtipo H1N1 (figura 32) indicou que, antes da vacinação, apenas o grupo TI apresentou títulos de anticorpos elevados, apesar de ter ocorrido aumento após 6 semanas em todos os grupos (NT $p< 0.0005$; TI $p<0.05$). Entretanto em idosos NT, houve queda significativa após 24 semanas ($p<0.005$). Um dado interessante é que o grupo fisicamente ativo, TI, apresentou títulos superior aos idosos NT desde a fase pré vacinação ($p= 0.011$ respectivamente), e isto foi reprodutivo nos períodos subsequentes (6 semanas: $p= 0.021$; 24 semanas: $p= 0.030$).

Figura 32. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H1N1. NT idosos não treinados, $n=15$. TI idosos treinados intensamente, $n = 22$. Θ pré vacinação NT vs TI ($p = 0.0116$) π pré vacinação vs seis semanas pós-vacinação TI ($p<0.05$), $*$ pré vacinação vs seis semanas pós-vacinação NT ($p<0.0005$), $\#$ seis semanas pós-vacinação vs vinte e quatro semanas NT ($p<0.005$), ϵ seis semanas pós-vacinação NT vs TI ($p = 0.0218$), Ω vinte e quatro semanas pós-vacinação NT vs TI $p= 0.0306$. Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

No subtipo H3N2 (figura 33), por sua vez, idosos TI apresentaram títulos elevados no período que antecede a vacinação e, assim como no subtipo anterior, houve aumento significativo deste em todos os grupos, após 6 semanas (NT $p<0.05$; TI $p<0.0005$), apesar da queda significativa observada em idosos NT após 24 semanas ($p<0.05$). Curiosamente, neste subtipo viral, após 24 semanas, foram os idosos TI que apresentaram títulos significantemente superiores em relação aos do período que antecede a vacinação ($p<0.005$). A comparação entre os grupos evidenciou comportamento similar com o subtipo H1N1, isto é, após 6 semanas da vacinação ambos os idosos TI tiveram títulos superiores aos dos idosos NT ($p=0.018$), e este aumento também foi superior após 24 semanas nos idosos TI ($p=0.011$). Estes resultados apontam para um possível papel adjuvante do treinamento físico na melhora da resposta vacinal.

Figura 33. Cinética dos títulos de anticorpos anti-H3N2. NT idosos não treinados, $n=15$. TI idosos treinados intensamente, $n = 22$. β pré vacinação vs seis semanas pós-vacinação TI ($p<0.0005$), γ pré vacinação vs vinte e quatro semanas pós-vacinação TI ($p<0.005$), α pré vacinação vs seis semanas pós-vacinação NT ($p<0.05$), Φ seis semanas pós-vacinação vs vinte e quatro semanas NT ($p<0.05$), $\bullet$ seis semanas pós-vacinação NT vs TI ($p = 0.0184$), ϵ vinte e quatro semanas pós-vacinação NT vs TI ($p= 0.011$). Dados apresentados em média geométrica e intervalo de confiança. Linha tracejada corresponde ao valor de título protetor ≥ 40 .

Sabe-se que, atualmente, o crescimento populacional de idosos é um fenômeno mundial proeminente, resultante da redução da mortalidade infantil, do tratamento de inúmeras doenças, eficácia dos métodos de diagnóstico precoce, dentre outros fatores. Entretanto, a prevalência desta faixa etária ocasiona mudanças e consequências na sociedade, nos aspectos econômicos, sociais, culturais e principalmente na saúde, sendo este o fator mais preocupante devido aos altos índices de morbidade e mortalidade nos idosos (61). Uma das causas para tais prevalências está atrelada às diversas disfunções do sistema imunitário com o avanço da idade, caracterizada pela imunossenescência, as quais contribuem para uma maior incidência de doenças infecciosas ou mesmo crônico-degenerativas na população idosa. Isto ocorre porque, quando a homeostase é reduzida, torna-se comprometida a capacidade de adaptação do indivíduo no que diz respeito às agressões internas e externas, acarretando sua maior susceptibilidade a doenças. Além disso, outros achados clínicos atrelados à senescência, como a perda de massa muscular, aumento dos níveis plasmáticos de proteínas de fase aguda e diminuição sérica de microelementos essenciais, como o zinco estão relacionados com a diminuição da homeostase (62). Tendo em vista que o sistema imunológico é um dos mais atingidos pelos efeitos deletérios causados pela imunossenescência, e por ser um sistema relacionado à homeostase do organismo, faz-se necessário compreender possíveis causas e potenciais consequências associadas às alterações, bem como possíveis estratégias intervencionistas que visem amenizar tais consequências e melhorar a qualidade de vida, como o exercício físico. Por esta razão, o objetivo do nosso estudo foi o de verificar se o treinamento físico aeróbico intenso e regular em idosos é capaz de proteger/retardar o processo de envelhecimento do sistema imunológico, uma vez que, atualmente, existem crescentes evidências favoráveis para esta prática, ou até mesmo acelerar o processo de envelhecimento, por se tratar de uma modalidade de alto impacto, “supra fisiológica”.

No que diz respeito à casuística do estudo, consideramos como pré-requisito para sua formação a auto-percepção de saúde positiva, isto é, foram incluídos na coorte apenas aqueles idosos que considerassem satisfatório o próprio estado geral de saúde, uma vez que existe relação desta percepção com enfermidades de acordo com estudos que constataram que fatores como otimismo, satisfação com a vida e felicidade estão associados a um menor risco de doenças, como as cardiovasculares (63). Sendo assim, realizamos os ensaios imunológicos em idosos com uma boa condição clínica, em

especial os pertencentes ao grupo NT, os quais estavam muitos próximos do ponto de vista clínico daqueles que praticavam atividade física intensa. Todos os idosos apresentaram autopercepção de serem saudáveis além de um perfil de melhora nos fatores psico- sociais, sempre interagindo com os demais participantes. Além disso, elidimos aqueles que passaram a apresentar características excludentes da pesquisa (como diabetes não controlada, hipertensão não controlada, uso de álcool/tabaco), as quais poderiam afetar diretamente o sistema imunológico, devido à inter-relação existente nos sistemas neuro-imuno-endócrino (64). Isto foi primordial na tentativa de evitar um possível viés de resposta nos resultados imunológicos, uma vez que os idosos ativos apresentaram menor perfil de características excludentes, estando aparentemente em vantagem com relação aos que não praticavam atividade física. Entretanto, tais fatores podem ser considerados um fator limitante da pesquisa, uma vez que não trabalhamos com a amostragem que melhor caracteriza a saúde real da população com idade superior a 60 anos, e sim um possível subgrupo de “elite” desta.

No que tange as alterações oriundas pela imunossenescência, sabe-se que as mais substanciais envolvem a imunidade adaptativa, principalmente no compartimento de linfócitos T. Um evento central crítico responsável por este processo é a alteração fisiológica do timo, caracterizada pela substituição do tecido funcional pelo fibroadiposo, fato que resulta na redução de células *naive* e aumento das células de memória (central e efetora), o que se supõe reduzir a funcionalidade das células frente a novos estímulos antigênicos, e constituindo um dos possíveis mecanismos responsáveis pela maior susceptibilidade a novas infecções.

Com o intuito de verificar tais alterações, analisamos o perfil fenotípico dos idosos estudados e constatamos que, concordante com a literatura (65), ambos os grupos apresentaram elevado percentual de células T de memória, sendo que o grupo TI apresentou maior proporção de células T_{ME}, tanto na subpopulação CD4⁺ como CD8⁺ que o grupo NT. Estas células efetoras refletem um estágio de maturação importante, envolvido na resposta imediata após a re-exposição ao antígeno, uma vez que estes foram recentemente ativados, circulando entre o sangue e o tecido periférico (66). Este dado condiz com o elevado potencial de resposta proliferativa observada em maior escala nos linfócitos T CD4⁺ de memória, seguido em menor escala nos linfócitos T CD8⁺CD28⁺, em relação às suas contrapartidas T CD4⁺ *naive* e T CD8⁺28⁻, respectivamente

(evidenciado principalmente quando estimulado com mitógeno, mas também observado após estímulo com antígeno CMV), além de possivelmente estar relacionado com a manutenção elevada dos títulos protetores de anticorpos anti-*Influenza* verificados no grupo TI como veremos mais adiante.

Apesar da evidente resposta proliferativa se concentrar no compartimento de células T CD4⁺ de memória, as diferenças estatísticas entre os grupos estudados ocorreram nos linfócitos T CD4⁺ *naive* estimulados com PHA, sendo a resposta proliferativa maior nos idosos TI. Isto evidencia que estas também se mantêm funcionais, sugerindo uma possível sensibilidade frente à prática de exercício físico nesta subpopulação de célula. Esta proliferação de células *naive* pode ser explicada pelo processo de homeostase biológica, ou seja, pela auto-regulação do organismo para a manutenção do número de células, em resposta a linfopenia ocasionada pela involução tímica, evidenciada em modelo animal (67). Neste modelo, o “pool” de célula T CD4⁺ *naive* foi mantido pela expansão de células T CD4⁺ na periferia, podendo ser evidenciada durante o envelhecimento pela importante redução do teor de círculo excisional (TREC - indicador de ciclos replicativos em células recém emigradas do timo) nestas células. Em humanos, o aumento da proliferação dos linfócitos T CD4⁺ *naive* têm sido reportada em indivíduos acima de 65 anos e crianças timectomizadas (68, 69). Acredita-se que, provavelmente, a linfopenia parcial em decorrência da perda da função do timo seja responsável por aumentar as taxas de proliferação (70). Em recém-nascidos, a proliferação de células T periféricas parece ser responsável por 50% da produção diária de células T e, em adultos, esta porcentagem torna-se mais elevada (71). Neste sentido, nossos resultados podem sugerir que em idosos intensamente ativos, o processo de homeostasia biológica seja mais evidente do que nos que não praticam atividade física.

Avaliamos também alguns parâmetros do chamado Perfil de Risco Imunológico (IRP), caracterizado por alterações que estão relacionadas ao aumento da morbidade em idosos. Dentre as alterações, incluem-se a inversão da relação CD4:CD8 (72), a qual não foi consistentemente observada nos indivíduos idosos de ambos os grupos, uma vez que apenas 20% destes apresentaram relação CD4:CD8 < 1. Outra questão em potencial é a infecção latente por CMV, por induzir a produção de uma variedade de agentes pró-inflamatórios que estão relacionados com diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, artrite reumatóide, além de ocasionar a formação de

um repertório altamente antígeno-específico de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, podendo comprometer até 50% do repertório de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) [28, 29, 30]. Em nosso estudo, mais de 90% dos idosos de ambos os grupos apresentaram sorologia positiva para CMV, índice esperado para idosos de nosso meio. Além disso, dados da literatura indicam que, nos idosos, a infecção persistente por CMV induz a expansão preferencial de clones CD8⁺, entretanto, a capacidade de resposta proliferativa neste compartimento celular foi praticamente inexistente em ambos os grupos, sendo que a maior capacidade de resposta estava concentrada nos linfócitos T CD4⁺, especificamente nas células de memória, as quais aparentam manter preservados os mecanismos anti-apoptóticos nos idosos pertencentes ao grupo TI (evidenciados pela redução da expressão de caspase-3 e aumento de Bcl-2, com diferenças estatísticas comparativamente às células *naive*). Além disso, foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos na ausência de estímulos resposta, isto é, idosos do grupo NT apresentavam constitutivamente menor expressão de Bcl-2 e maior expressão de caspase-3 (via final comum da apoptose), em ambas as subpopulações estudadas, em comparação com o grupo TI. Isto pode indicar uma tendência à perda dos mecanismos homeostáticos regulados pela proteína anti-apoptótica Bcl-2, fato que tornaria as células mais vulneráveis ao estresse fisiológico e, conseqüentemente, culminaria na morte celular programada. Este é um dado interessante, por indicar que, mesmo em “repouso”, uma pequena porcentagem das células de idosos que não praticam atividade física possui vias de apoptose ativadas. Vale ressaltar que a PHA utilizada como estímulo mitogênico nos ensaios de apoptose não foi capaz de evidenciar diferenças entre os grupos, provavelmente por se tratar de um estímulo suprafisiológico e que induz altas taxas de proliferação celular e, subseqüentemente, de morte celular. Desta forma, diferenças discretas entre os grupos podem ficar mascaradas com este estímulo.

Contudo, estudos demonstram que os dados a cerca de possíveis alterações nos níveis de apoptose no processo de imunossenescência são ainda controversos. Dados obtidos por Aggarwal e colaboradores, 1998 (24) mostraram que a expressão do Fas/FasL estava aumentada nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (tanto os *naive* quanto os de memória) em indivíduos idosos (65- 95 anos) quando comparados com os linfócitos de indivíduos jovens (20- 29 anos). Além disso, a expressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2 encontrava-se diminuída. Já em estudo realizado em indivíduos

centenários, a expressão do Fas em linfócitos de memória encontrava-se aumentada, enquanto a expressão do FasL estava diminuída (25).

Outro fator associado ao IRP é o aumento de linfócitos T_{EMRA}, os quais representam o estágio de diferenciação final de linfócitos, apresentando pouca ou nenhuma capacidade proliferativa e alta sensibilidade a apoptose (73). Entretanto, apesar dos idosos dos nossos grupos não apresentarem uma elevada frequência de risco nas populações de linfócitos T estudadas, a prevalência da sua expressão no grupo foi maior no grupo NT, tanto em linfócitos T CD4⁺ como T CD8⁺. Os dados acerca do IRP sugerem que a prática de atividade física intensa aeróbia regular parece ter tido uma repercussão positiva no compartimento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, uma vez que os idosos TI apresentaram uma menor população de células T_{EMRA}, subpopulação comumente encontrada em idosos e associada à imunossenescência (74).

Outra característica importante na imunossenescência é a perda de expressão da molécula co-estimulatória CD28, responsável pela geração do segundo sinal para ativação das células T (29). Tal fato está associado ao declínio da funcionalidade celular, incluindo diminuição da ativação e proliferação, redução da secreção de IL-2 e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Em nossos resultados, observamos uma maior frequência de células senescentes (CD28⁻) no compartimento de linfócitos T CD8⁺, em ambos os grupos, o que é o esperado uma vez que a perda desta molécula é mais pronunciada no compartimento citotóxico, T CD8⁺, do que em L TCD4⁺ (72). Apesar da maior frequência de células senescentes na subpopulação CD8⁺, a funcionalidade (capacidade proliferativa) é superior nas células que mantêm a expressão da molécula. Já no compartimento de linfócitos T CD4⁺, ambos os grupos de idosos apresentaram predominância da expressão de CD28⁺, indicando que a perda da molécula neste compartimento celular é um evento raro. É interessante notar o comportamento do grupo TI e a possível influência do exercício sobre as células T. Não podemos descartar a hipótese de uma possível recirculação dos linfócitos T CD8⁺ senescentes, o que levaria à sua eliminação por apoptose (29), possibilidade consistente com a redução da expressão de Bcl-2 *in vitro* pelas células CD28⁻ estimuladas com PHA do grupo TI.

Outro dado interessante diz respeito à senescência replicativa, na qual observamos que células TCD3⁺CD8⁺, bem como sua subpopulação senescente (CD28⁻), apresentaram maior comprimento do telômero nos idosos do grupo TI que no grupo

NT, indicando provável efeito protetor da modalidade de atividade física estudada nas extremidades cromossômicas, fato que condiz com a visual diminuição da capacidade mitogênica proliferativa destas células. Por outro lado, nas células CD4+, não houve diferenças entre os grupos, apesar de observarmos em geral medianas sempre discretamente maiores no grupo TI em relação ao grupo NT.

Dados da literatura sobre efeitos do exercício físico no comprimento do telômero são ainda controversos. Denham J, 2013, (75) encontrou associação positiva entre a prática de ultra-maratona (superior a dois anos) em homens de meia idade e o comprimento do telômero nos leucócitos, sendo que no grupo fisicamente ativo os telômeros foram 11% mais longos do que no grupo controle, sugerindo que o envolvimento regular na prática desta modalidade aeróbica atenua o envelhecimento celular. Estes resultados suportam dados anteriores obtidos por LaRocca, 2010 (76), no qual foram estudados indivíduos jovens (18-32 anos) e idosos (55-72 anos), com e sem treinamento em exercícios de resistência aeróbica (superior a 5 anos) e os resultados indicaram que o comprimento dos telômeros dos leucócitos estava preservado nos idosos ativos, sendo positivamente relacionado com a capacidade máxima de exercício aeróbico. Entretanto tais alterações foram observadas apenas durante o envelhecimento, uma vez que não foram verificados tais efeitos entre indivíduos jovens ativos e/ou sedentários, presumivelmente porque o comprimento do telômero está ainda preservado nestas populações. Tendo em vista a observação de que o tamanho do telômero diminui com o avanço da idade, os autores deste trabalho sugerem que haja uma preservação por conta do exercício aeróbico crônico extenuante. Por outro lado, Marthur *et al*, 2013, reportaram que corredores de maratona adultos apresentaram comprimento dos telômeros em linfócitos e granulócitos comparáveis aos de controles sedentários (77), ou seja, não houve associação entre a atividade física aferida pelo VO₂ máx e o comprimento do telômero de linfócitos e granulócitos do sangue periférico. Já em nosso estudo, os resultados evidenciaram que exercício físico intenso está associado à preservação dos telômeros em linfócitos T CD28-, célula alvo da imunossenescência, fato que repercute no maior comprimento do telômero em linfócitos T CD8+ e T totais (linfócitos T CD3+).

De acordo com a literatura, as diferenças nas alterações do sistema imunológico observadas nos idosos poderiam ser explicadas pelo *Inflammaging*, processo inflamatório

de baixo grau, crônico e sistêmico, sendo um determinante de doenças neurodegenerativas, diabetes, aterosclerose dentre outras patologias. Diversos são os fatores que contribuem para sua manutenção, dentre elas, o tabagismo, obesidade e infecção por CMV (78). Curiosamente, verificamos que a funcionalidade das células frente ao antígeno CMV foi maior no compartimento de memória dos linfócitos T CD4+, uma vez que, no compartimento de linfócitos T CD8+, esta resposta foi praticamente inexistente e este evento foi evidenciado de maneira similar nos dois grupos estudados.

Vale ressaltar a importância de se estudar o *Inflammaging*, uma vez que ele está diretamente relacionado com o aumento da mortalidade entre os idosos. Além disso, a expectativa de vida pode ser influenciada pelo tipo de citocinas produzidas, ou seja, há uma maior sobrevida nos indivíduos geneticamente predispostos a uma resposta inflamatória de baixa intensidade, do que aqueles que apresentam longos períodos de ativação imunológica constante, pelo acometimento de doenças relacionadas com o envelhecimento (79). Neste cenário, altos níveis de IL-6 aparecem como fatores predisponentes à incapacidade funcional e morbi-mortalidade, assim como elevações de PCR, TNF-alfa e IFN-gama (80). Em nosso estudo, em ambos os grupos, verificamos após estímulo mitogênico a produção de IL-2 seguida por IL-6, TNF, IFN- γ e IL-10 e IL-4 com uma produção muito próxima do limite mínimo de detecção, com notável confirmação das funções efetoras da resposta imunológica de ativação e proliferação; já após estímulo antigênico, por sua vez, observamos elevada secreção de IL-6. Em nosso estudo não foram observados efeitos do exercício crônico e intenso na secreção de citocinas e interleucinas durante resposta imunológica.

O mesmo ocorreu na caracterização do estado subclínico “pró-inflamatório”, na qual os maiores níveis séricos detectados foram da quimiocina IL-8, seguido pela citocina IL-6. O fato de não termos observado um quadro inflamatório que reforçaria a hipótese do *inflammaging* pode estar atrelado à seleção dos indivíduos idosos do nosso estudo. Muitos são os fatores que favorecem a permanência de citocinas inflamatórias circulantes, como a associação com diversas doenças: diabetes, aterosclerose e doenças cardiovasculares, (81), as quais, não estavam presentes nos idosos participantes. Além disso, ambos os grupos de idosos apresentavam estilo de vida “normal”, todos ativos para rotinas do cotidiano (apesar dos pertencentes do grupo NT não realizarem atividade física) e com auto-percepção de saúde positiva. Isso nos leva a refletir que o estilo de

vida possui influência no surgimento e manutenção do quadro inflamatório relatados no inflammaging, pois o mesmo não foi observado na casuística deste projeto.

Por fim, a piora da capacidade funcional dos linfócitos T e B verificados durante a imunossenescência repercutem também no comprometimento do processo de vacinação, levando a proteção em torno de 17-53% nos idosos, enquanto nos jovens esse número varia de 70-90% (82). Este fato pode ser explicado pelo desequilíbrio entre respostas regulatórias e respostas mediadas por células T de memória (83), além da diminuição da especificidade dos anticorpos, da afinidade e troca de classe dos isotipos (84). Segundo Ongrádi *et al.*, 2011 alterações quantitativas incluem a redução do número de imunoglobulinas e as qualitativas as alterações no número e na atividade das subpopulações de células B, bem como as mudanças no repertório dos anticorpos. Desta forma, a principal consequência está na capacidade reduzida de desenvolver uma resposta imune humoral robusta (84).

Os dados imunológicos referentes à produção de anticorpos frente a vacina contra a gripe trivalente, incluíram dois subtipos de influenza A (H1N1 e H3N2) e um subtipo B. Em geral, idosos do grupo TI apresentaram títulos protetores (acima de 1:40) contra todos os subtipos, embora esse aumento na resposta ao subtipo B tenha ocorrido apenas após seis semanas da vacinação. Em contrapartida, no grupo NT, verificamos títulos protetores apenas contra o subtipo H3N2, no período de seis semanas após a vacinação. Isto pode representar um possível efeito protetor do exercício físico intenso na resposta vacinal, especialmente no que tange o subtipo H3N2. Com base nos dados epidemiológicos, tal subtipo representa o maior risco para as pessoas idosas em relação ao H1N1 ou influenza B, e os indivíduos do grupo TI conseguiram manter níveis mais elevados de anticorpos do que o grupo NT, após seis semanas da vacinação. O mesmo aumento dos títulos ocorreu no subtipo B, que se mostrou menos imunogênico dentre os subtipos analisados em nosso estudo, após seis semanas da vacinação no grupo TI. A maior capacidade de resposta vacinal nos indivíduos TI pode estar relacionada à maior frequência das células polifuncionais T_{ME} , conforme citado anteriormente, além de uma possível relação do “estresse físico” (atribuído ao grupo TI) com o desencadeamento de uma resposta inflamatória muscular, o que aumentaria a eficiência da apresentação antigênica durante a imunização (82). Sabe-se que a resposta ao estresse observada mesmo em pouco tempo após o exercício físico, ocasiona alterações significativas no

sistema imune, com aumento dos parâmetros, como: frequência cardíaca, pressão sanguínea, epinefrina, cortisol, leucocitose, além da diapedese, quando há presença de lesão muscular. Além disso, o aumento do fluxo dos vasos linfáticos para órgãos linfóides secundários após contrações musculares são também evidentes e auxiliam em aumentar o alerta para possíveis “sinais de perigo”, ocasionando melhorias de prontidão. Em outras palavras, o exercício produz um ambiente pró-inflamatório favorecendo aumento do *homing* de linfócitos para o sítio de aplicação da vacina, além do aumento da captação e processamento do antígeno, favorecendo a eficiência da resposta imune (82).

Por fim, a robusta resposta imunológica *in vivo* observada na vacinação condiz com relatos da literatura. Diversos estudos transversais examinaram a associação entre atividade física e resposta imune frente à vacinação contra influenza, com associação positiva entre treinamento crônico intenso e soroproteção. Apesar de Kohut *et al*, 2002, (85) verificarem aumento de anti-influenza IgG e IgM no grupo que praticava atividade física intensa, este se deu apenas 14 dias após a vacinação, em comparação com indivíduos que praticavam atividade física moderada, ou até mesmo que não praticavam exercícios, enquanto em nosso estudo, o aumento se deu nos dois momentos pós vacinação. Além disso, os autores não analisaram subtipos virais específicos, como em nosso estudo. Apesar de apresentar efeitos benéficos para idosos ativos, este estudo possui algumas limitações, uma vez que, para delineamento da casuística, ou seja, para avaliações do condicionamento físico não foram utilizados dados do VO₂máx e sim a seleção foi feita por um recrutamento telefônico, o que torna a classificação dos grupos de estudo subjetiva. Além disso, este estudo foi realizado em idosos ativos há pelo menos um ano, enquanto em nosso estudo, a prática teve média de 15 anos, tempo suficiente para causar mudanças em hábitos do cotidiano que possivelmente repercutem no sistema imunológico.

Assim como este, outro estudo transversal examinou a função imune na vacinação em grupos de idosos com diferentes níveis de atividade física regular. Entretanto, não houve discriminação dos grupos de acordo com o perfil cardiorrespiratório, bem como detalhamento da modalidade de atividade física estudada, dado relevante para uma eventual futura prescrição de exercícios nesta faixa etária pelos geriatras. Além disso, o *score* de atividade física obtido correlacionava-se positivamente com o título de somente 1 dos 2 subtipos de vírus testados, apenas 1 semana pós

vacinação (dado não suficiente para medir a resposta vacinal), e não houve correlação com 2, 4 e 6 semanas pós vacinação. Ou seja, no momento de “pico” da resposta anticórpica (após seis semanas), não houve aumento dos títulos, indicando que este estudo não teve forte associação com a atividade física e melhora vacinal (86).

Em outro estudo foi avaliada a resposta vacinal contra Influenza, em idosos com elevado condicionamento físico vs baixo condicionamento físico, sendo os grupos delimitados de acordo com o perfil cardiovascular obtido pelo VO_2 máx (87). Neste estudo, assim como no nosso, houve o cuidado de selecionar cuidadosamente aqueles idosos que mantêm um histórico de vacinação anual ativa, uma vez que isto poderia influenciar na resposta vacinal subsequente. Os resultados demonstraram que os idosos com baixo condicionamento físico não responderam à vacinação, diferente dos nossos resultados onde ambos os grupos produziram títulos de anticorpos durante os períodos avaliados (com exceção do subtipo B), além de não haver diferença nos títulos entre os grupos estudados. Além disso, a melhora significativa na resposta vacinal observada em idosos com alto condicionamento físico (em dois dos três subtipos estudados, H1N1 e B) evidencia uma vantagem do treinamento intenso neste compartimento da imunidade humoral. Entretanto, este grupo poderia representar um biotipo dos “atletas de elite”, devido ao elevado valor de VO_2 máx verificado (mediana: 46.8ml/Kg/min), uma vez que, em nosso estudo, os idosos com treinamento intenso para maratona apresentavam um valor inferior (35mL/Kg/min), porém com aumento significativo dos títulos durante os períodos da vacinação, sendo também significativo quando comparado com o dos idosos que não praticam atividade física. Isto poderia indicar que não somente os “atletas de elite” possuem benefícios na resposta vacinal.

Além disso, outro trabalho que vem sendo realizado em nosso grupo de estudo visa avaliar os mesmos parâmetros imunológicos aqui apresentados, porém, em idosos que praticam atividade física moderada e regular. Os resultados acerca da vacinação também mostraram títulos maiores de anticorpos em relação aos indivíduos que não praticam atividade física (Silva *et al.* dados não publicados), entretanto, foram visivelmente inferiores aos dos indivíduos que praticam atividade intensa, apesar de não haver diferenças estatísticas.

Já em estudo intervencionista realizado por Kohut, 2004, (88) houve aumento da resposta vacinal por conta do exercício físico de intensidade moderada, apesar de este aumento ter sido verificado apenas três meses após a vacinação (no nosso trabalho, o aumento ocorreu inclusive após seis meses). Além disso, este estudo reproduz os dados obtidos por nós quanto à pior resposta imunogênica do subtipo B. Além deste, outro estudo intervencionista de intensidade moderada verificou efeito protetor 24 semanas após a vacinação, entretanto, diferente do observado em nosso estudo, não houve diferenças significantes entre os grupos no subtipo B (89).

Apesar de os estudos apresentados nesta discussão apresentarem distintos delineamentos, acreditamos que o efeito benéfico na resposta vacinal e outros parâmetros que repercutem na qualidade de vida poderiam estar atrelados à prática de exercícios físicos como um estilo de vida, isto é, uma opção própria do indivíduo, diferente do observado em exercícios intervencionistas, em que há supervisão e vigilância, muitas vezes sem manutenção na adesão aos exercícios após o período de estudo por parte dos indivíduos. Além disso, tendo em vista que as modificações relacionadas em resposta ao estresse são evidentes na prática do exercício agudo, acreditamos que, no exercício crônico, como delineado em nosso estudo, tais efeitos sejam constantes, sem que ocorra a normalização destes após 24-48 horas, como ocorre no agudo. Uma de nossas hipóteses iniciais era de que a prática de atividade física “supra-fisiológica” causaria efeitos nocivos ao organismo, em especial ao sistema imunológico. Diante disso, apesar de não termos verificado melhora de alguns dos parâmetros imunológicos estudados no grupo TI, aqueles parâmetros que não diferiram dos do grupo NT apontam para ausência de efeitos deletérios ocasionados pelo exercício físico intenso.

7- Conclusão

Os parâmetros imunológicos avaliados no presente estudo nos permitem concluir que a prática da atividade física intensa e regular atenuou alguns parâmetros associados à imunossenescência. Sendo assim, concluímos que houve:

- maior frequência de linfócitos T_{ME} e menor frequência de linfócitos T_{EMRA} em células T CD4⁺ e T CD8⁺;
- maior comprimento do telômero em linfócitos T CD3⁺ CD8⁺ CD28⁻ (célula alvo da imunossenescência);
- maior capacidade de resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ *naive* estimulados com mitógeno PHA;
- aumento da produção sérica de títulos de anticorpos anti-influenza pré e pós-vacinação, com manutenção de títulos acima dos níveis protetores nos três subtipos analisados.
- produção elevada de IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN-g por *PBMC's* estimulados com mitógeno e de IL-6 com antígeno e concentrações indetectáveis de IL-4;
- nível sérico elevado de citocinas inflamatórias: IL-6, IL-8; baixos níveis de IL-1 β , TNF e IL-12p70 e da citocina anti-inflamatória IL-10; níveis não detectáveis de IFN-g;
- aumento da expressão de Bcl-2 e redução de caspase-3 em células não estimuladas TCD4⁺ CD45RO⁺/RO⁻ e células TCD8⁺ CD28⁺/28⁻

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: Efeito da atividade física de alto desempenho aeróbico regular na resposta imune e no encurtamento do telômero em linfócitos T 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 de alto desempenho aeróbico regular (maratona) 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. Será realizada uma única coleta de 50 mL de sangue (cerca de meio copo) distribuída em 5 tubos com heparina como anticoagulante, por punção periférica da veia do antebraço para a realização de exame no qual vão ser feitas medidas sobre sua imunidade.” Excepcionalmente, poderá ser realizada uma segunda coleta, se houver necessidade de repetição do exame.

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, Adriana Ladeira de Araújo 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 “Efeito da atividade física de alto desempenho aeróbico regular na resposta imune e no encurtamento do telômero em linfócitos T 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, semi-analfabetos 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 ____/____/____

9. Referências

1. Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, LaVoy EC, Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev.* 2012 Jul;11(3):404-20
2. Freitas, EV. Tratado de geriatria e gerontologia. 2ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2006.
3. Confort, A . The biology of senescence. 3ed. Nova Iorque: *Elsevier*, 1979, pp. 27-42
4. Kikuchi EL, Filho, WJ. Geriatria e Gerontologia Básica. 1ed.Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2012, pp. 2-10.
5. Arnold CR, Wolf J, Brunner S, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstien B. Gain and loss of T cell subsets in old age--age-related reshaping of the T cell repertoire. *J Clin Immunol.* 2011 Apr; 31(2):137-46
6. 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 Oct;35(5):1521-30
7. Targonski PV, Jacobson RM, Poland GA. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine.* 2007 Apr 20;25(16):3066-9.
8. Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.* 2006 May 8; 236(1):13-23
9. Frasca D, Landin AM, Riley RL, Blomberg BB. Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J Immunol.* 2008 Mar; 1;180(5):2741-6.
10. Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity.* 2006 May; 24(5):491-4.
11. Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol.* 2004 Feb;5(2):133-9.
12. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol.* 1986; 75:43-88.

13. Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol*. 2000 Jul;20(4):250-6
14. Lazuardi L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grubeck-Loebenstein B. Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. *Immunology*. 2005 Jan; 114(1):37-43.
15. Bartlett DB, Firth CM, Phillips AC, Moss P, Baylis D, Syddall H, Sayer AA, Cooper C, Lord JM. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):912-5.
16. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2009. Disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/index.html. Acesso em 16 de Julho de 2011.
17. 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.
18. Griffiths, AFF, Wessler, SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Introdução à Genética*. 9. L. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2008
19. Jardim L.B., L L. Prêmio Nobel De Fisiologia e Medicina 2009: O Papel dos Telômeros e da Telomerase na manutenção dos cromossomos. *Rev HCPA* 2009; 29: 271-275
20. 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 May;156(10):3587-90
21. 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 Nov 21;92:11091
22. Parish ST, Wu JE, Effros RB. Sustained CD28 expression delays multiple features of replicative senescence in human CD8 T lymphocytes. *J Clin Immunol*. 2010 Nov;30(6):798-805.
23. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transplant International*. 2009; 22: 1041-1050

24. Aggarwal S, Gupta S. Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol.* 1998 Feb 15;160(4):1627-37.
25. Pinti M, Troiano L, Nasi M, Monterastelli E, Moretti L, Bellodi C, Mazzacani A, Mussi C, Salvioli G, Cossarizza A. Development of real time PCR assays for the quantification of Fas and FasL mRNA levels in lymphocytes: studies on centenarians. *Mech Ageing Dev.* 2003 Apr;124(4):511-6
26. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2010 Mar; 104:183-190
27. Brunner S, Herndler-Brandstetter D, Weinberger B and Grubeck-Loebenstein B: Persistent viral infections and immune aging. *Ageing Res Rev.* 2011 Jul;10(3):362-9.
28. Simpson RJ. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise "make space"? *Exerc Sport Sci Rev.* 2011 Jan; 39(1):23-33
29. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, et al. 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 Mar;79(6):3675-83.
30. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005 Sep;202(5):673-85
31. Rocha MOC, Pedroso ERP, Santos AGR. *Infectologia Geriátrica.* 3 ed. São Paulo: *Fundo Editorial BYK*, 1997, 3: 57-64.
32. Senchina DS, Kohut ML. Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging.* 2007;2(1):3-16.
33. de Araújo AL, da Silva LCR, Fernandes JR, Benard G. Preventing or reversing immunosenescence. Can exercise be an immunotherapy in the elderly? *Immunotherapy* 2013 Aug; 5(8): 879-93.
34. Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, et al. 1993. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exer*, 25:823–31.
35. Shinkai S, Kohno H, Kimura K, et al. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exer*, 1995 Nov;27:1516–26.

36. Shinkai S, Konishi M, Shephard RJ. Aging and immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998 May;76:562–72.
37. Werner C, Furster T, Widmann T, Poss J, Roggia C et al. Physical Exercise Prevents Cellular Senescence in Circulating Leukocytes and in the Vessel Wall. *Circulation*. 2009 Dec;120:2438-2447.
38. Rosa LF P B C, Vaisberg, MW. Influências do exercício na resposta imune. *Rev Bras Med Esporte* 2002; 8 (4): 167- 72
39. Nieman., D C. Marathon Training and Immune Function. *Sports Med* 2007; 37 (4-5): 412-415
40. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol*. 1998 Aug;16(8):743-7.
41. 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 Mar-Apr; 25(2A): 1039-50.
42. 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 Oct. *J Immunol Methods*. 2010. 31;362(1-2):43-50.
43. Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, et al. Brazilian-Portuguese version of the SF-36. A reliable and valid quality of life outcome measure. *Rev Bras Reumatol* 1999; 39(3): 147-50.
44. Mungas D. In-office mental status testing: a practical guide. *Geriatrics* 1991 Jul; 46(7): 54-8, 63,66.
45. Emed TCXS, Kronbauer A, Magnoni, D. Mini-avaliação nutricional como indicador de diagnóstico em idosos de asilos. *Rev Bras Nutri Clín* 2006; 21(3): 219-23.
46. Abu-Omar K, Rütten A. Relation of leisure time, occupational, domestic, and commuting physical activity to health indicators in Europe. *Prev Med*. 2008 Sep; 47(3):319-23.
47. 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:S259-64

48. Huggett DL, Connelly DM, Overend TJ. Maximal aerobic capacity testing of older adults: a critical review. *Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005 Jan; 60(1):57-66.
49. Blackie SP, Fairbairn MS, McElvaney GN, Morrison NJ, Wilcox PG, Pardy RL. Prediction of maximal oxygen uptake and power during cycle ergometry in subjects older than 55 years of age. *Am Rev Respir Dis*. 1989 Jun; 139(6):1424-9.
50. Bouchard C, Daw EW, Rice T, Pérusse L, Gagnon J, Province MA, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH. Familial resemblance for VO_2max in the sedentary state: the HERITAGE Family Study. *Med Sci Sports Exerc* 1998 Feb; 30: 252–58.
51. Neder JA, Nery LE, Castelo A, Andreoni S, Lerario MC, Sachs A, Silva AC, Whipp BJ. Prediction of metabolic and cardiopulmonary responses to maximum cycle ergometry: a randomised study. *Eur Respir J*. 1999 Dec;14(6):1304-13.
52. Meyer T.; Faude O.; Urhausen A.; Scharhag J.; Kindermann W. Different effects of two regeneration regimens on immunological parameters in cyclists. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2004 Oct; 36:1743-1749.
53. Pfister G, Weiskopf D, Lazuardi L, Kovaïou RD, Cioca DP, Keller M, Lorbeig B, Parson W, Grubeck-Loebenstien B. Naïve T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci*. 2006 May; 1067:152-7
54. Alves NL, Hooibrink B, Arosa FA, van Lier RA. IL-15 induces antigen-independent expansion and differentiation of human naïve CD8+ T cells in vitro. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2541-6.
55. 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 Apr;43(4):266-74.
56. Wikby, A., Johansson, B., Olsson, J., Lofgren, S., Nilsson, B.O., Ferguson, F., 2002. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp. Gerontol*. 2002 Jan-Mar; 37,445–453.
57. 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. *The Journal of Immunology*. 1996, 156:3587-3590.
58. Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naïve and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Nov. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 Nov; 21 92(24):11091-4

59. Bartlett DB, Firth CM, Phillips AC, Moss P, Baylis D, Syddall H, Sayer AA, Cooper C, Lord JM. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):912-5.
60. 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 Aug;34(5):633-44.
61. Grimble RF. Inflammatory response in the elderly. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Jan;6(1):21-9
62. Cabrera ÁJ. Zinc, aging, and immunosenescence: an overview. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2015 Feb 5;5:25592.
63. Boehm JK, Kubzansky LD. The heart's content: the association between positive psychological well-being and cardiovascular health. *Psychol Bull*. 2012 Jul;138(4):655-91.
64. Calcagni E, Elenkov I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Jun;1069:62-76.
65. Vescovini R, Fagnoni FF, Telera AR, Bucci L, Pedrazzoni M, Magalini F, Stella A, Pasin F, Medici MC, Calderaro A, Volpi R, Monti D, Franceschi C, Nikolich-Zugich J, Sansoni P. Naïve and memory CD8 T cell pool homeostasis in advanced aging: impact of age and of antigen-specific responses to cytomegalovirus. *Age (Dordr)*. 2014 Apr;36(2):625-40.
66. Campbell JP¹, Riddell NE, Burns VE, Turner M, van Zanten JJ, Drayson MT, Bosch JA. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. *Brain Behav Immun*. 2009 Aug;23(6):767-75.
67. Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999 Nov; 18,402: 255–262.
68. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, Witkowski J, Fulbright J, Weyand CM, Goronzy JJ. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol*. 2005 Jun 1;174(11):7446-52.

69. Prelog M, Keller M, Geiger R, Brandstätter A, Würzner R, Schweigmann U, Zlamy M, Zimmerhackl LB, Grubeck-Loebenstein B. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4 CD45RA CD62L T cell compartment in later life. *Clin Immunol*. 2009 Feb;130(2):123-32.
70. Sara Ferrando-Martínez, Ezequiel Ruiz-Mateos, Ana Hernández, Encarnación Gutiérrez, Maria del Mar Rodríguez-Méndez, Antonio Ordoñez, and Manuel Leal. Age related desregulation of naïve t cell homeostasis in elderly humans. *Age (Dordr)*. 2011; 33(2): 197–207.
71. Schonland, S. O., J. K. Zimmer, C. M. Lopez-Benitez, T. Widmann, K. D. Ramin, J. J. Goronzy, and C. M. Weyand.. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* 2003 Aug; 15,102: 1428 –1434.
72. Pritz T, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging bone marrow and its impact on immune responses in old age. Institute for Biomedical Aging Research, Universität Innsbruck, Rennweg 10, Innsbruck, Austria. *Immunology Letters*. 2014 Nov; 162 (1 Pt B): 310–315
73. Carrasco J, Godelaine D, Van Pel A, Boon T, van der Bruggen P. CD45RA on human CD8 T cells is sensitive to the time elapsed since the last antigenic stimulation. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):2897-905.
74. Di Benedetto S, Derhovanessian E, Steinhagen-Thiessen E, Goldeck D, Müller L, Pawelec G. Impact of age, sex and CMV-infection on peripheral T cell phenotypes: results from the Berlin BASE-II Study. *Biogerontology*. 2015 Mar 3.
75. Denham J, Nelson CP, O'Brien BJ, Nankervis SA, Denniff M, Harvey JT, Marques FZ, Codd V, Zukowska-Szczechowska E, Samani NJ, Tomaszewski M, Charchar FJ. Longer leukocyte telomeres are associated with ultra-endurance exercise independent of cardiovascular risk factors. *PLoS One*. 2013 Jul 31;8(7):e69377.
76. LaRocca TJ, Seals DR, Pierce GL. Leukocyte telomere length is preserved with aging in endurance exercise-trained adults and related to maximal aerobic capacity. *Mech Ageing Dev*. 2010 Feb;131(2):165-7.
77. Mathur S, Ardestani A, Parker B, Cappizzi J, Polk D, Thompson PD. Telomere length and cardiorespiratory fitness in marathon runners. *J Investig Med*. 2013 Mar;61(3):613-5.
78. Macaulay R, Akbar AN, Henson SM. The role of the T cell in age-related inflammation. *Age (Dordr)*. 2013 Jun;35(3):563-72

79. Barbieri M, Rizzo MR, Manzella D, Grella R, Ragno E, Carbonella M, Abbatecola AM, Paolisso G. Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Exp Gerontol*. 2003 Jan-Feb;38(1-2):137-43.
80. Salvioli, S. et al. Genes, ageing and longevity in humans: problems, advantages and perspectives. *Free Radic Res*, v. 40, n. 12, p.1303-23, Dec. 2006.
81. 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 Jul;139:49-57.
82. Pascoe AR, Fiatarone Singh MA, Edwards KM. The effects of exercise on vaccination responses: a review of chronic and acute exercise interventions in humans. *Brain Behav Immun*. 2014 Jul;39:33-41.
83. Haq K, McElhaney JE. Immunosenescence: Influenza vaccination and the elderly. *Curr Opin Immunol*. 2014 Aug;29:38-42.
84. Ongrádi J, Kövesdi V. Numerical alterations of ageing B lymphocyte subsets. *Acta Physiol Hung*. 2011 Jun;98(2):99-104.
85. 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 Sep;57(9):M557-62.
86. Schuler PB, Leblanc PA, Marzilli TS. 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*. 2003 Sep;43(3):404.
87. Keylock, K.T., Lowder, T., Leifheit, K.A., Cook, M., Mariani, R.A., Ross, K., Kim, K., Chapman-Novakofski, K., McAuley, E., Woods, J.A., 2007. Higher antibody, but not cell-mediated, responses to vaccination in high physically fit elderly. *J. Appl. Physiol*. 2007 Mar;102(3):1090-8.
88. 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 Jun 2;22(17-18):2298-306.
89. 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 Dec;57(12):2183-91.