

Manuella de Sousa Toledo Matias

**Efeito da atividade física regular de alto desempenho aeróbico
na resposta imune e no encurtamento do telômero em
linfócitos T de idosos**

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

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme

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

Matias, Manuella de Sousa Toledo

Efeito da atividade física regular de alto desempenho aeróbico na resposta imune e no encurtamento do telômero em linfócitos T de idosos / Manuella de Sousa Toledo Matias. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Luiz Eugênio Garcez Leme.

Descritores: 1.Telômero 2.Envelhecimento/imunologia 3.Atividade física
4.Idoso 5.Linfócitos T 6.Qualidade de vida 7.Cognição

USP/FM/DBD-321/15

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Leonardo por seu incentivo,
apoio e compreensão para a realização deste
trabalho e às minhas filhas Ana Isabel e Ana
Flávia.*

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Drs. Gilberto Luis Camanho, Olavo Pires de Camargo e Tarcísio E. P. de Barros Filho, pela oportunidade de realizar este estudo no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Em especial ao Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme, meu orientador, pelos valiosos ensinamentos.

A todos os pacientes que participaram deste estudo pela colaboração com a ciência médica.

À Sra. Tânia Borges, pela amizade, atenção e cuidado aos detalhes burocráticos.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	7
2.1	Objetivo geral.....	7
2.2	Objetivos específicos.....	7
3	CASUÍSTICA.....	8
4	MÉTODOS.....	9
4.1	Avaliação laboratorial.....	10
4.2	Avaliação física.....	11
4.3	Medida dos telômeros em linfócitos T.....	11
5	RESULTADOS.....	12
6	DISCUSSÃO.....	19
7	CONCLUSÕES.....	25
8	ANEXOS.....	26
9	REFERENCIAS.....	42
10	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
ANOVA	Análise de variância
CMV	Citomegalovírus
CMA	Cândida albicans
CORPORE	Grupo de corredores do estado de São Paulo
CD	Molécula co-estimulatória para iniciação de uma resposta imune;
EDG	Escala de depressão geriátrica
FISH	Técnica de hibridação in situ por fluorescência
FMUSP	Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo
IL	Interleucina
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
IOT	Instituto de ortopedia e traumatologia
IPAQ	Questionário internacional de nível de atividade física
IFN	Interferon
Kb	Kilobase – medida de comprimento de telômero
LIM-56	Laboratório de investigação médica em dermatologia e imunodeficiências
VO ₂	Consumo de oxigênio
MAN	Mini avaliação nutricional
MET	Equivalente metabólico(1 Kcal- Kg – hora)
MEEM	Mini exame do estado mental
PBMC	Suspensão de células mononucleares do sangue periférico
SF36	Questionário para avaliar qualidade de vida; (Short Form 36)
SUS	Sistema único de saúde
TCRs	Receptores nas células T – linfócitos T
TNF	Fator de necrose tumoral
VO ₂ MÁX	Consumo máximo de oxigênio

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Relação da média do CD4+RO+ e exercício Físico.....	15
Gráfico 2	Relação da média do CD4+RO- e exercício Físico.....	16
Gráfico 3	CD8+CD28+ e exercício Físico.....	16
Gráfico 4	CD28+CD28- e exercício Físico.....	17
Gráfico 5	SF36 e exercício Físico.....	17
Gráfico 6	MEEM e exercício Físico.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da média entre grupos - Atividade Física.....	12
Tabela 2	Comparação da média entre grupos - Atividade Física.....	13
Tabela 3	Comparação da média entre grupos – Cognição.....	13
Tabela 4	Comparação da média entre grupos – Telômeros.....	14
Tabela 5	Correlação entre os dados (Teste de Spearman).....	14

RESUMO

Matias MST. *Efeito da atividade física regular de alto desempenho aeróbico na resposta imune e no encurtamento do telômero em linfócitos T de idosos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O aumento na expectativa de vida da população justifica o interesse em compreender melhor o processo de envelhecimento. Uma projeção recente do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística prevê que a população de idosos vai triplicar até 2050. Esse aumento trará para o sistema de saúde do Brasil um desafio. O aumento do número de doenças, o comprometimento imunológico, a diminuição da resposta às vacinas são evidenciados na população idosa. A associação entre encurtamento do telômero e senescência celular tem sido estabelecida laboratorialmente. Neste estudo avaliamos comparativamente três grupos de indivíduos idosos quanto à atividade física na categoria de alto desempenho, moderado desempenho e sedentário. Comparamos o comprimento do telômeros em linfócitos T entre os grupos citados. Avaliamos a cognição, a qualidade de vida e incidência de depressão dos idosos dos grupos citados. **MÉTODOS:** Os pacientes foram selecionados no ambulatório do Instituto de Ortopedia e Traumatologia da Universidade de São Paulo. Avaliamos as características clínicas, funcionais, qualidade de vida, depressão, cognição, miniavaliação nutricional, imunidade e medida do telômeros em linfócitos T. **RESULTADOS:** Foi detectada correlação estatística significativa entre a medida do telômeros em linfócitos e CD8CD28- e a atividade física. Foi, também, detectada diferença na mini avaliação mental e consumo de O₂. **CONCLUSÕES:** Comprovou-se diferença estatística entre a medida do telômeros em linfócitos e CD8CD28- bem como na cognição e a atividade física.

Descritores: Telômero; Envelhecimento/imunologia; Atividade física; Idoso; Linfócitos T; Qualidade de vida; Cognição.

SUMMARY

Matias MST. *Effect of high-performance regular physical activity and immune response telomere shortening in T lymphocyte in elderly* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: The increase in population life expectancy justifies the interest in better understanding the aging process. A recent projection of the Brazilian Institute of Geography and Statistics predicts that the elderly population will triple by 2050. This increase will bring a challenge to the healthcare system in Brazil. The increase in the number of diseases, the immunological impairment, and the decreased response to vaccines are evident, especially in the elderly population. The association between telomere shortening and cellular senescence has been established in a laboratory setting. In this study we compared three groups of elderly individuals regarding their physical activity in the categories of high performance, moderate performance and sedentary. We compared telomere length in T cells between the aforementioned groups. We evaluated the cognition and incidence of depression in the elderly of the aforementioned groups. **METHODS:** Patients were selected from the clinic of the Institute of Orthopedics and Traumatology, University of São Paulo. We evaluated the clinical characteristics, functional characteristics, quality of life, depression, cognition, nutritional mini-assessment, immunity and telomere length in T cells. **RESULTS:** A statistically significant correlation was found between telomere length in CD8CD28- T cells and physical activity. Also, differences in the mental mini assessment and the consumption of O₂ were detected. **CONCLUSION:** A statistically significant correlation was proven between the length of the telomeres in CD8CD28- T cells and cognition, as well as in physical activity.

Descriptors: Telomere; Aging /immunology; Motor Activity; Aged; T-Lymphocytes; Quality of life; Cognition.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional aumentou de forma significativa nas últimas décadas. Uma projeção recente do IBGE (**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010**) prevê que a população de idosos vai triplicar até 2050, passando dos atuais 10,8% para 29,7% da população total do país, correspondendo a quase 65 milhões. A expectativa de vida ao nascer aumentou na última década (1999 a 2009); entre as mulheres passou de 73,9 para 77 anos e entre os homens de 66,3 para 69 anos. Este envelhecimento do Brasil trará um desafio cada vez maior para o SUS (Sistema Único de Saúde), pois os idosos apresentam um número maior de doenças crônicas e que contribuem para perda da funcionalidade, declínio na qualidade de vida. A consequência é o aumento da demanda dos serviços públicos de saúde com maior número de internações hospitalares e uso de instituições de longa permanência (**Hazzard et al., 2003; Freitas e Py, 2006**). O crescimento desproporcional da população de idosos ocasionará aumento significativo na prevalência das demências (déficit cognitivo), síndrome de fragilidade e fraturas de colo de fêmur, afecções muito frequentes nos países desenvolvidos. Assim, a busca de ações preventivas e terapêuticas, de baixo custo e eficácia comprovada, faz-se necessária no combate a esses riscos de alta prevalência e que comprometem a qualidade de vida, parâmetro priorizado no atendimento em geriatria.

O envelhecimento, segundo **Comfort (1979)** é caracterizado pela incapacidade de manutenção da homeostasia em condição de sobrecarga

funcional. O envelhecimento pode ser visto como um processo dinâmico e progressivo em que há modificações morfológicas, funcionais, psicológicas e bioquímicas que determinam a perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente e a perda da reserva funcional, com maior incidência de processos patológicos que terminam por levá-lo a morte.

As alterações que ocorrem no sistema imunológico com o avanço da idade comprometem sua competência e são definidas pela imunosenescência. Neste processo, a resposta inata adaptativa é afetada, com alterações que incluem, em geral, a diminuição da fagocitose, alteração da migração celular, mudanças nas populações celulares e a diminuição da habilidade em produzir anticorpos específicos **(Weiskopf et al., 2009; Agarwal e Busse, 2010)**, quando falamos em resposta imune celular, destacamos a atividade de macrófago via fagocitose.

As mudanças relacionadas ao sistema imune adaptativo que envolve os linfócitos T incluem a diminuição do número de células T naive e assim a diminuição da eficácia de resposta às imunizações e infecções, e aumento do número de células de memória (caracterizadas pelo fenótipo CD45RO). Os linfócitos T naive correspondem ao grupo de células B ou células T maduras provindas de órgãos linfoides que nunca encontraram um antígeno diferente. A expectativa de vida destas células é de 1 a 3 meses, caso não encontrem nenhum antígeno **(Abbas et al., 2008)**. Estudos demonstraram que os linfócitos T naives de indivíduos idosos apresentam alterações funcionais, incluindo encurtamento do telômero em linfócitos T, restrição no repertório dos receptores nas células T (TCRs), diminuição da produção da Interleucina I e interleucina II, diferenciação e expansão em células efetoras comprometidas

quando comparadas com linfócitos naive de indivíduos jovens. A fase efetora da imunidade mediada por células é realizada pelos linfócitos T e os anticorpos não desempenham papel na erradicação dos patógenos que vivem fora das células do hospedeiro. As fases da imunidade mediada por células consistem na ativação de células T virgens que proliferam e diferenciam-se em células efetoras e na eliminação dos microorganismos associados às células pela ação destas células efetoras (**Abbas et al., 2008**).

Alterações fenotípicas ocorrem também no compartimento de células T efetoras, tais como a perda da expressão CD28, que interage com CD80 e/ ou CD86 na superfície das células apresentadoras de antígenos - APCs. Uma importante molécula co-estimulatória que fornece o segundo sinal essencial para a iniciação de uma resposta imune é o CD 28. O acúmulo de linfócitos T, em particular os CD8+, que perdem a expressão de CD28 durante o envelhecimento, correlaciona-se com vários desfechos clínicos, incluindo a diminuição do controle sobre a infecção. A capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-2, também se encontra limitada nas células T CD28-, e devido aos sucessivos ciclos replicativos a que foram submetidas ao longo da vida, estas células apresentam diminuição do comprimento dos telômeros em linfócitos T (**Pfister et al., 2006**).

Telômeros, do grego telos, término e meros parte, foram apresentadas em trabalhos no final dos anos 1930 pelos geneticistas norte-americanos Hermann Muller (1890-1967) e Barbara McClintock (1902-1992), e definidas pela sua função protetora dos terminais dos cromossomos, sendo capazes de impedir eventos danosos para os mesmos e considerados importantes na manutenção da integridade do genoma (**Griffiths et al., 2011**). A associação

entre encurtamento do telômero em linfócitos T e senescência celular tem sido estabelecida laboratorialmente. Em fibroblastos diplóides, linfócitos T e células hematopoiéticas, a média do comprimento do telômero em linfócitos T reduz a cada divisão celular *in vitro*. Por esta razão, estudos baseados na literatura revelam que a transfecção do gene da transcriptase reversa da telomerase em várias células somáticas pode resultar num alongamento do comprimento dos telômeros e extensão da vida replicativa *in vitro* (**Rufer et al., 1999; Ahmed e Tollefsbol, 2003; Baerlocher et al., 2003**).

Estudo realizado por **Werner et al. (2009)** verificou 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 nos telômeros dos linfócitos T do endotélio dos vasos e na apoptose endotelial em camundongos, bem como os efeitos do treinamento de resistência a longo prazo sobre a biologia dos telômeros em linfócitos T dos seres humanos. Os resultados demonstraram aumento da atividade da telomerase aórtica, (telomerase encontrada nas células endoteliais da aorta) estabilização dos telômeros em linfócitos T dos 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 RNAm). Quando avaliados os efeitos da atividade física nos telômeros em linfócitos T de humanos, atletas profissionais jovens e atletas de meia idade foram comparados com seus respectivos controles sedentários de idades similares. O comprimento do telômero em linfócitos T (realizado pelos métodos de Flow-FISH e PCR) mostrou-se reduzido nos leucócitos dos controles de meia idade e esta erosão

estava diminuída em atletas de meia idade (**Werner et al., 2009**). Estes dados sugerem que os efeitos benéficos do exercício físico sobre as proteínas dos telômeros em linfócitos T e os fatores associados à senescência ocorrem nos leucócitos de atletas jovens. Nos atletas de meia idade com histórico de exercício de longo prazo e contínuo foi encontrada um aumento da atividade da telomerase, além da conservação do comprimento dos telômeros em linfócitos T. De acordo com Werner, esses achados podem melhorar a compreensão molecular dos efeitos benéficos da atividade física vascular, além de implicar num efeito "antienvhecimento" do exercício físico.

Estudo realizado por **Østhus et al. (2012)**, pode concluir que o VO₂MÁX está associado positivamente com o comprimento do telômero em linfócitos T e ainda informa que a atividade física de alto desempenho em longo prazo pode proteger o comprimento do telômero em linfócitos T em musculatura de pessoas idosas.

Tais observações sugerem que o comprimento do telômero em linfócitos T possa ser utilizado como um indicador de divisões celulares in vivo, sendo este um fator importante no controle do tempo de vida celular, apesar de ainda permanecerem questões abertas a respeito da participação dos fatores que influenciam na atividade da telomerase, o que pode influenciar no comprimento do telômero em linfócitos T, podendo possivelmente variar entre os indivíduos (**Slagboom et al., 1994; Rufer et al., 1999; Ahmed e Tollefsbol et al., 2003**).

Estudos recentes ainda citam a relação de algumas afecções comuns no idoso, como diabetes, insuficiência cardíaca, obesidade e depressão e o encurtamento do telômero em linfócitos T, comparativamente a idosos saudáveis, sendo mais curto em idosos doentes (**Nordfjäll et al., 2008**;

Wolkowitz et al., 2011; Shioi e Inuzuka, 2012; Hovatta et al., 2012; Jugdutt et al., 2012).

Clinicamente, as consequências oriundas da imunosenescência podem tornar os indivíduos idosos mais suscetíveis a desenvolverem infecções bacterianas e virais. Malignidades e autoimunidade decorrentes do estado de imunosenescência também levam ao aumento do índice de morbidade e mortalidade (**Agarwal e Busse et al., 2010**).

Devido aos impactos causados pela imunosenescência sobre o sistema imune dos indivíduos idosos, de acordo com **Senchina e Kohut (2007)**, têm-se intensificado as investigações de terapias que possam amenizar tais consequências, como a prática do exercício físico. Este tem recebido atenção científica por sua eficácia, por apresentar 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.

Dessa forma tivemos como objetivo neste estudo, a avaliação dos efeitos da prática da atividade física de alto e moderado desempenho aeróbico regular na longevidade, avaliando a qualidade de vida, cognição, telômero em linfócitos T e resposta imune, visto necessidade de mais trabalhos, na literatura, ratificando a eficácia desta prática.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da prática da atividade física de alto e moderado desempenho aeróbico regular na qualidade de vida, medida de telômero em linfócitos T e resposta imune

2.2 Objetivos específicos

- Comparar o comprimento dos telômeros em linfócitos T de idosos submetidos à atividade física de alto e moderado desempenho aeróbico regular e idoso sedentários, em subpopulações de linfócitos T CD4+CD45RO+ (memória) e T CD4+CD45RO- (naive) e subpopulações de linfócitos T CD8+CD28+ e T CD8+CD28-;
- Avaliar a qualidade de vida e cognição dos idosos ativos, comparado com os sedentários.

3 CASUÍSTICA

O estudo foi realizado com três grupos de indivíduos do sexo masculino maiores de 60 anos. Um grupo foi formado por idosos que praticam atividade física regular de alto desempenho aeróbico (corredores de fundo em provas acima de 15000 metros, incluindo meias-maratonas e maratonas); o segundo grupo foi formado por idosos que praticam voleibol adaptado, considerado atividade física moderada e o terceiro grupo foi formado por idosos sedentários. Foram excluídos do estudo indivíduos que apresentam comorbidades de impacto para o sistema imunológico (AIDS, mieloma, artrite reumatóide.) e/ou que fizeram uso de medicamentos imunossupressores. Poderiam ser incluídos no estudo indivíduos portadores de comorbidades 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). Os grupos de atividade física de alto desempenho e sedentários fazem 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. O grupo dos indivíduos com atividade física moderada foi recrutado através do programa “Saber Viver” da Secretária de Esportes da cidade de Cotia – SP.

4 MÉTODOS

Foi feita a seleção dos grupos pelo tipo de atividade física ou a ausência da realização desta.

Foi colhida a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido após explicação do mesmo.

Três grupos foram formados: de alto desempenho, moderado desempenho e sedentário:

- Grupo 1: Corredores de fundo em provas acima de 15000 metros (incluindo meia maratonas e maratonas) – grupo de atletas de alto desempenho;
- Grupo 2: Praticantes de voleibol adaptado – Programa Saber Viver da Secretaria da Cidade de Cotia/SP – grupo de atletas de moderado desempenho;
- Grupo 3: Sedentários – Ambulatório do Instituto de Ortopedia da FMUSP.

Foram aplicados os critérios de exclusão e inclusão, realizada anamnese e exame físico em todos os selecionados.

Foram aplicados questionários específicos: para avaliar depressão no idoso utilizamos a versão reduzida da Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage (Anexo 3) (**Yesavage et al., 1982-1983; Fountoulakis et al., 1999; Almeida & Almeida, 1999**); nutrição MAN (mini avaliação nutricional) (**Rubenstein et al., 2001**), cognição MEEM (mini exame do estado mental) para avaliar cognição (**Brucki et al., 2003**); condição física IPAQ (questionário

internacional de atividade física – versão reduzida) (**Anexo 5**) (**Craig et al., 2003**) e para avaliar a qualidade de vida o questionário SF-36 (**Ciconelli et al., 1999**).

Foram medidos parâmetros laboratoriais básicos (glicemia, hemograma, uréia e creatina, enzimas hepáticas e sorologia anti-CMV). Foram avaliadas a composição corpórea e a densidade mineral óssea de corpo inteiro através de análise densitométrica, realizada no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo.

Foi realizado o teste ergoespirométrico para avaliar o VO₂ MAX parâmetro que ratifica ou retifica o grupo no qual o paciente está classificado pelo IPAQ.

Reclassificação dos pacientes pós-resultado do IPAQ e do VO₂.

Todos os grupos tiveram sua condição clínica atual avaliada através de exame clínico e avaliação geriátrica global incluindo avaliação cognitiva e de humor (questionário sobre depressão e mini-exame de estado mental) (**ANEXOS 3 e 4**).

4.1 Avaliação laboratorial

Foram avaliados parâmetros laboratoriais básicos (glicemia, hemograma, uréia e creatina, enzimas hepáticas e sorologia anti-CMV).

4.2 Avaliação física

Para determinar o nível de atividade física empregamos o Questionário Internacional de Nível de Atividade Física (IPAQ) (**ANEXO 5**). O resultado obtido foi convertido para MET's. Os indivíduos foram submetidos ao teste ergoespirométrico. Os testes foram realizados utilizando o teste de Heck modificado.

4.3 Medida dos telômeros em linfócitos T

Para análise foi utilizada hibridização com citometria de fluxo. Por se tratar de procedimento de recente aquisição descrevemos em detalhe o processamento das amostras conforme consta no Anexo 6.

5 RESULTADOS

Os resultados entre os grupos sedentário, moderado e atleta podem ser observados nas Tabelas de 1 a 5 e nos Gráficos de 1 a 6.

Tabela 1 - Comparação da média entre grupos - Atividade Física

Variável	Grupo	n	Média	Desv.Pad.	Norm. (KS) ρ	Kruskal-Walis p	Dunn:		
							Sed/Mod	Sed/Atl	Mod/Atl
<i>Cp. funcional</i>	Sedentário	17	80,3	3,5	0,0158	0,0961	NA	NA	NA
	Intermediário	25	92	2,3	>0,10				
	Atleta	22	92,7	2	0,0025				
<i>Dor</i>	Sedentário	17	77	5,8	0,0389	0,6979	NA	NA	NA
	Intermediário	25	79,5	3,7	>0,10				
	Atleta	22	82,2	3,8	>0,10				
<i>Est.ger.Saúde</i>	Sedentário	17	73,6	4,4	>0,10	0,7314	NA	NA	NA
	Intermediário	25	76,2	3,6	>0,10				
	Atleta	22	80,7	3,5	>0,10				
SF36 <i>Vitalidade</i>	Sedentário	17	72,7	3,9	>0,10	0,1999	NA	NA	NA
	Intermediário	25	75,4	3,4	0,0692				
	Atleta	22	67,9	5,3	>0,10				
<i>Asp. sociais</i>	Sedentário	17	79,4	6,8	<0,0001	0,7873	NA	NA	NA
	Intermediário	25	88,5	5	<0,0001				
	Atleta	22	84	4,4	0,0001				
<i>Asp. Emoc.</i>	Sedentário	17	67,4	9,5	0,0037	0,4054	NA	Não	Não
	Intermediário	25	93,3	4,3	<0,0001				
	Atleta	22	74,6	8	0,0004				
<i>S. mental</i>	Sedentário	17	78,3	4,1	>0,10	0,2424	NA	NA	NA
	Intermediário	25	74,6	3,3	0,0634				
	Atleta	22	76,7	3,6	>0,10				
Idade, média \pm DP	Sedentário	17	72,9	1,5	>0,10	0,55	NA	NA	NA
	Intermediário	25	70,4	0,7	>0,10				
	Atleta	22	74,8	1,5	>0,10				
IMC, kg/m ²	Sedentário	17	25,3	0,8	>0,10	0,1075	NA	NA	NA
	Intermediário	25	24,7	0,4	>0,10				
	Atleta	22	23	0,4	>0,10				
Comorbidades	Sedentário	17	3,071	2,129	>0,10	0,089	NA	NA	NA
	Intermediário	25	1,9	0,8522	0,0015				
	Atleta	22	1,588	1,326	0,067				
Medicação	Sedentário	17	14	3,429	>0,10	0,064	NA	NA	NA
	Intermediário	25	20	2,15	0,0021				
	Atleta	22	17	1,588	0,024				

Na **Tabela 1** não se observa alterações em qualquer dos parâmetros entre os três grupos que são, assim, comparáveis.

Tabela 2 – Comparação da média entre grupos - Atividade Física

Variável	Grupo	n	Média	Desv.Pad.	Norm. (KS) p	Kruskal-Walis p	Dunn:		
							Sed/Mod	Sed/Atl	Mod/Atl
METs, min/week	Sedentário	17	144,7	64,7	<0,0001				
	Intermediário	25	1999	156,5	>0,10	< 0.0001	Não	Sim	Sim
	Atleta	22	4587	272	>0,10				
VO2MAX, ml/kg/min	Sedentário	17	24,6	0,6	>0,10				
	Intermediário	25	29,3	1	>0,10	0,0006	Sim	Sim	Não
	Atleta	22	35	1,4	>0,10				
IPAQ	Sedentário	17	290,5	698,9	0,0001				
	Intermediário	25	1564	717,4	>0,10	0	Sim	Sim	Sim
	Atleta	22	4380	1522	>0,10				
Temp trein. (anos)	Sedentário	17	NA	NA	>0,10				
	Intermediário	25	17	3,2	0,037	0,667	NA	NA	NA
	Atleta	22	25,9	3,4	>0,10				

No tocante à atividade física não se encontra diferença no tempo de treinamento (anos) entre o grupo intermediário e atleta. Por outro lado a análise da atividade em METs, VO2MAX e IPAQ são concordes em apresentar diferença significativa entre os grupos.

Tabela 3 – Comparação da média entre grupos – Cognição

Variável	Grupo	n	Média	Desv.Pad.	Norm. (KS) p	Kruskal-Walis p	Dunn:		
							Sed/Mod	Sed/Atl	Mod/Atl
Cognição MMSE	Sedentário	17	26,1	0,6	>0,10				
	Intermediário	25	28,2	0,4	0,0003	0,026	Sim	Sim	Não
	Atleta	22	27,8	1	0,0547				

No tocante à cognição, em que pese todos os grupos estarem dentro dos limites da normalidade, pode-se observar diferença significativa entre os grupos: sedentário e atleta e sedentário e intermediário.

Tabela 4 – Comparação da média entre grupos – Telômeros

Variável	Grupo	n	Média	Desv.Pad.	Norm. (KS) p	Kruskal-Walis p	Dunn:		
							Sed/Mod	Sed/Atl	Mod/Atl
RO+	Sedentário	17	1,432	0,4261	>0,10	0,829	NA	NA	NA
	Moderado	25	1,489	0,5066	>0,10				
	Atleta	22	1,572	0,5111	0,0399				
RO-	Sedentário	17	1,827	0,5662	>0,10	0,791	NA	NA	NA
	Moderado	25	1,882	0,7474	0,034				
	Atleta	22	1,95	0,5515	0,0799				
CD28+	Sedentário	17	1,516	0,4207	>0,10	0,622	NA	NA	NA
	Moderado	25	1,644	0,6229	0,034				
	Atleta	22	1,681	0,4754	>0,10				
CD28-	Sedentário	17	1,301	0,4219	>0,10	0,034	Não	(Sim)	Não
	Moderado	25	1,266	0,4221	0,0317				
	Atleta	22	1,535	0,3582	>0,10				

Na análise do comprimento dos telômeros (kp) pode-se observar diferença significativa com maior tamanho em atletas na análise de CD28-, não se observando diferença significativa nas outras variáveis.

Tabela 5 - Correlação entre os dados (Teste de Spearman)

	Idade	Comorbidades	Medicação	SF 36 %	MEEM	IPAQ	MAN	METs	VO2mx	RO+	RO-	CD28+	CD28-
Idade		0,028	0,101	-0,004	-0,122	0,013	0,05	0,088	-0,01	-0,182	-0,164	-0,173	-0,04
Comorbidades	0,028		0,739	-0,21	-0,024	-0,311	-0,098	-0,276	-0,183	0,189	0,23	-0,011	-0,018
Medicação	0,101	0,739		-0,18	-0,086	-0,291	-0,333	-0,162	-0,236	-0,006	0,029	-0,119	-0,023
SF 36 %	-0,004	-0,21	-0,18		0,18	0,267	0,22	0,386	0,47	-0,053	0,054	0,041	0,227
MEEM	-0,122	-0,024	-0,086	0,18		0,36	0,146	0,378	0,452	0,283	0,304	0,152	0,19
IPAQ	0,013	-0,311	-0,291	0,267	0,36		0,371	0,911	0,622	0,097	0,106	0,121	0,396
MAN	0,05	-0,098	-0,333	0,22	0,146	0,371		0,224	0,215	0,177	0,313	0,199	0,198
METs	0,088	-0,276	-0,162	0,386	0,378	0,911	0,224		0,728	0,149	0,207	0,051	0,376
VO2max	-0,01	-0,183	-0,236	0,47	0,452	0,622	0,215	0,728		0,077	0,071	0,108	0,263
RO+	-0,182	0,189	-0,006	-0,053	0,283	0,097	0,177	0,149	0,077		0,763	0,475	0,502
RO-	-0,164	0,23	0,029	0,054	0,304	0,106	0,313	0,207	0,071	0,763		0,333	0,402
CD28+	-0,173	-0,011	-0,119	0,041	0,152	0,121	0,199	0,051	0,108	0,475	0,333		0,681
CD28-	-0,04	-0,018	-0,023	0,227	0,19	0,396	0,198	0,376	0,263	0,502	0,402	0,681	

Na análise de correlação (Spearman) entre as variáveis pode-se observar correlação de idade com comorbidades, qualidade de vida, atividade física

(IPAQ, VO2 MAX, IPAQ), nutrição (MAN) e CD28-; correlação de comorbidades com idade, cognição (MEEM), CD28+ e CD28-; correlação de medicação com RO+, RO- e CD28-; correlação de qualidade de vida (SF36) com idade e com CD28+, correlação de cognição (MEEM) com comorbidades; correlação de atividade física (VO2MAX e IPAQ) com idade; correlação de nutrição (MAN) com idade. As medidas de telômeros correlacionaram-se com RO+ / medicação; RO- / medicação; CD28+ /comorbidades e qualidade de vida e CD28- / Idade, comorbidades e medicação.

Gráfico 1 – Relação da média do CD4+RO+ e exercício Físico

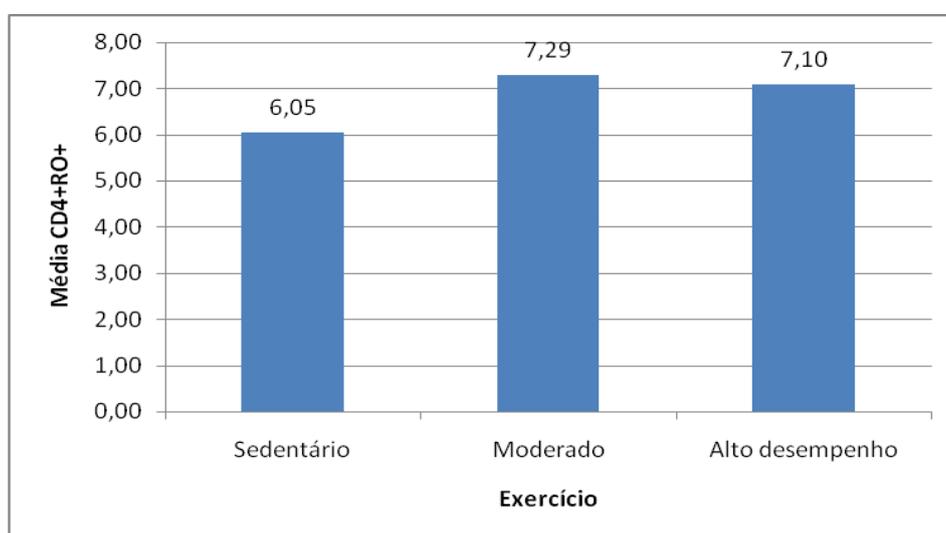


Gráfico 2 – Relação da média do CD4+RO- e exercício Físico

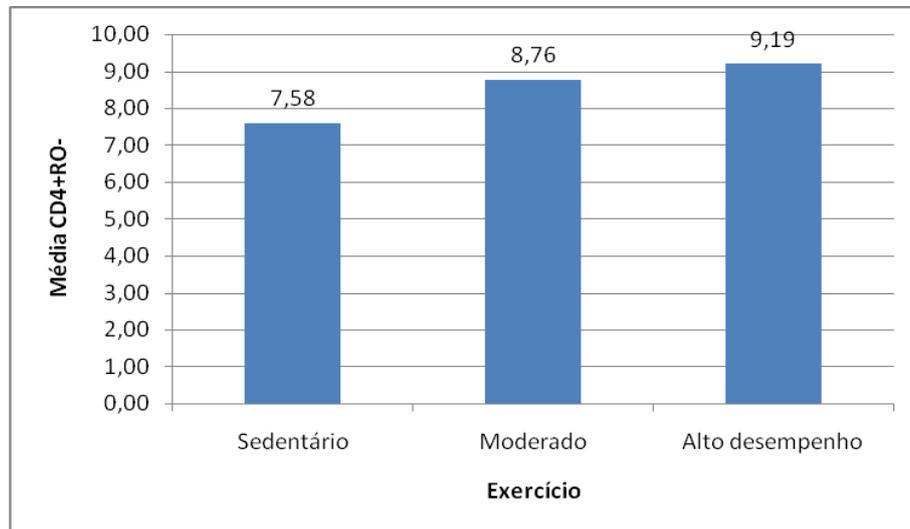


Gráfico 3 – CD8+CD28+ e exercício Físico

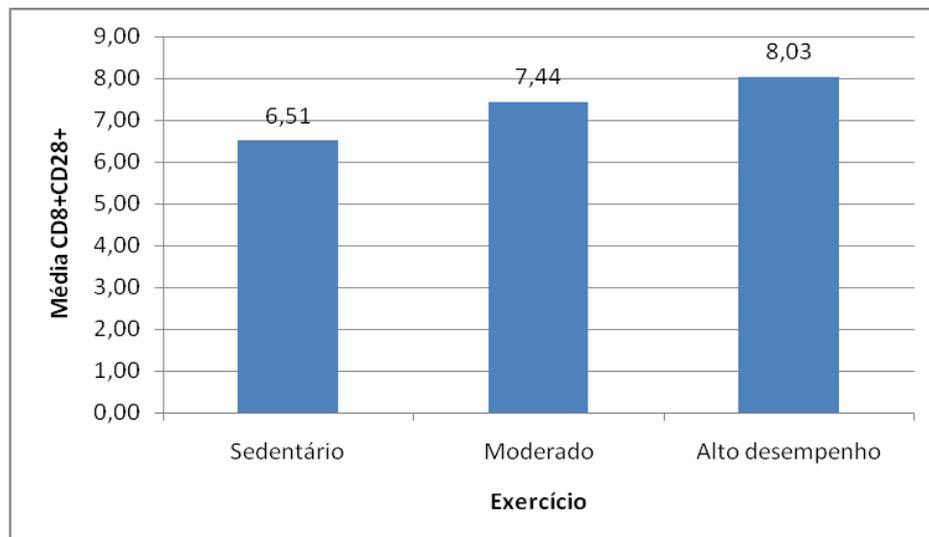


Gráfico 4 – CD28+CD28- e exercício Físico

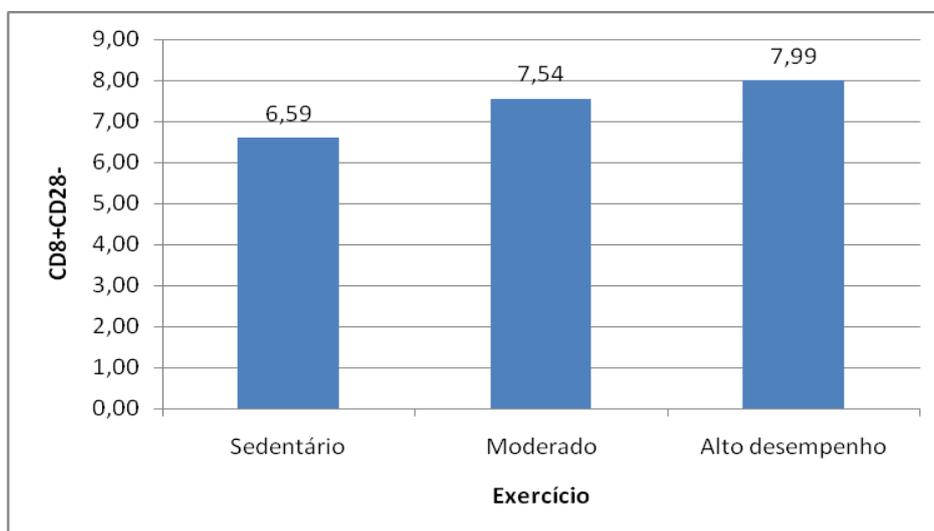


Gráfico 5 - SF36 e exercício Físico

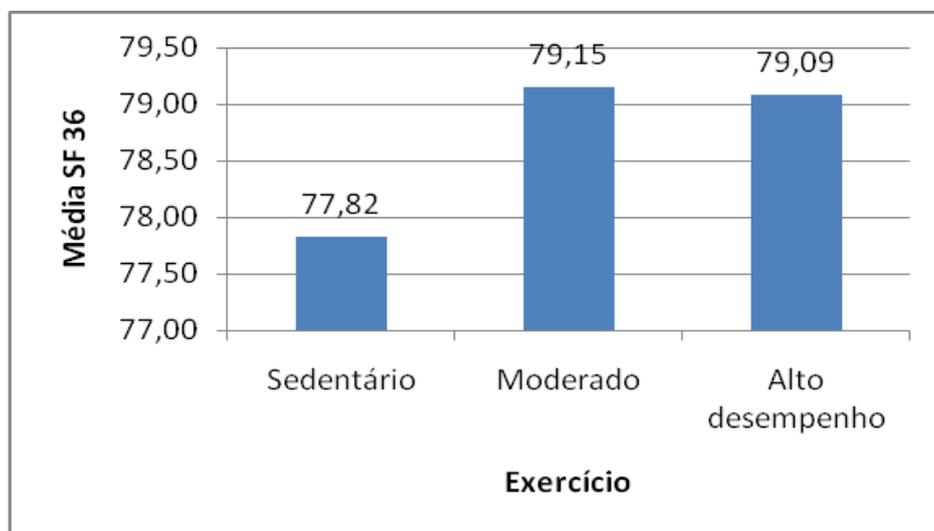
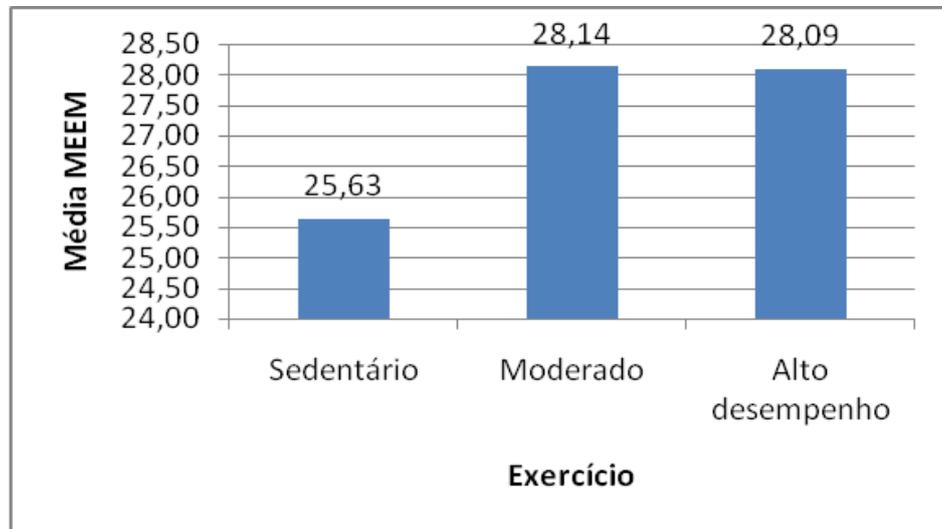


Gráfico 6 – MEEM e exercício Físico



6 DISCUSSÃO

No presente estudo, os grupos não apresentaram diferenças significativas em seus dados gerais. Como curiosidade, no que diz respeito à idade, o alto desempenho estava relacionado com indivíduos com maiores idades.

Um dos aspectos positivos do presente estudo é a comparabilidade entre os grupos estudados como pode ser observado na **Tabela 1**, incluindo idade, qualidade de vida em todos os seus componentes, IMC, nutrição, comorbidades e uso de medicação.

A análise de correlação (**Tabela 5**) entre as variáveis do grupo como um todo, independente da divisão por grupo de atividade, mostra-nos aspectos interessantes. Existem algumas correlações facilmente compreensíveis como a positiva da idade com comorbidades e a correlação negativa com qualidade de vida e atividade física (VO2 MAX); é também facilmente compreensível a correlação positiva das comorbidades com cognição (MEEM).

Existem ainda algumas correlações de compreensão mais difícil como da correlação positiva da idade com nutrição (MAN), atividade física (IPAQ).

No tocante às correlações das medidas de telômeros, encontramos correlação peculiar das comorbidades que é positiva com o comprimento de telômero de linfócito T CD8RO- e negativa entre o comprimento de telômero de linfócito T CD8RO+. Esta variação de correlações não apresenta de início uma explicação simples; no entanto deve-se ter em conta que múltiplos fatores podem responder pela presença de comorbidades múltiplas, sinal de limitação funcional no idoso e a medida simples desta variável pode não expressar,

ainda mais em uma casuística limitada como a nossa, sua real participação na funcionalidade destes indivíduos.

Quanto aos linfócitos T CD8CD28+, existe correlação positiva com qualidade de vida e negativa com comorbidades; aparentemente explicitando uma participação positiva na funcionalidade dos indivíduos estudados; já nos linfócitos T CD8CD28-, considerados padrão do envelhecimento (**Semba et al., 2005**), encontramos correlação negativa do comprimento do telômero com a idade, as comorbidades e o uso de medicação, explicitando sua função aparentemente protetora, de vez que sua diminuição corresponde a aumento de limitações funcionais.

Uma das mais interessantes análises desta casuística é relação múltipla entre os diversos parâmetros medidos e os grupos de atividade (sedentários, moderados e atletas) que pode ser observada na **Tabela 2**.

Quando passamos a analisar os parâmetros de nossa casuística divididos por grupos de atividades (sedentários, intermediário e atletas) os resultados mostram sua mais importante significação.

Uma conclusão inicial a que podemos chegar é que a autoreferência à atividade física pelos idosos que permitiu dividí-los nos três grupos de atividade é confiável. De fato a diferença das medidas de METs ($p < 0,0001$) VO2MAX ($p = 0,0006$) e IPAQ ($p = 0,0000$) é notável entre os grupos, qualificando a divisão inicialmente feita. Podemos assim considerar estas variáveis iniciais como variáveis de qualificação da amostra, que se mostraram positivas (**Tabela 2**). Este dado é de importância na prática quotidiana de vez que dados obtidos por questionários facilmente aplicáveis como o IPAQ (**Anexo 5**) podem servir para definições e pesquisas sobre atividade física, mesmo sem a aquisição do

VO2MAX através de avaliação ergoespirométrica, com notáveis vantagens em termos de aplicabilidade, dinâmica e custos.

Entre as variáveis clínicas, um dado muito importante refere-se à medida da cognição, avaliada através do Mini Exame do Estado Mental de Folstein (MEEM).

Em que pese os três grupos encontrarem-se dentro dos limites normais para a faixa etária (acima de 24 pontos) existe significativa ($p=0,0026$) diferença a favor dos grupos intermediário e atletas em relação ao grupo sedentário (**Tabela 3**). Este achado confirma de alguma maneira configura os benefícios cognitivos da atividade física, altamente desejáveis na senescência.

Diversos estudos têm relacionado à prática regular de atividade física em idosos a prevenção no declínio cognitivo (**Barnes et al., 2003; Abbott et al., 2004**).

Larson et al. (2006) mostraram que idosos que praticavam atividade física regular três ou mais vezes por semana tinham uma incidência 38% menor de doença de Alzheimer, em um seguimento de seis anos, quando comparado com um grupo semelhante de idosos com nível inferior de atividade física.

Scarmeas et al. (2009) em um estudo de coorte com 1880 idosos avaliaram a incidência de DA, com uma média de seguimento de 5,4 anos. Os idosos com maior nível de exercício apresentaram uma redução de risco de 33% comparado aos sedentários.

Middleton et al. (2011) avaliaram a relação entre gasto energético total e a incidência de déficit cognitivo em 197 idosos normofuncionais e sem demência. O estudo usou a técnica de água duplamente marcada, que é um

método de calorimetria indireta que mede com precisão o gasto energético total de indivíduos fora de confinamento, refletindo o nível de atividade física diário. Após seguimento de cinco anos foi observado uma menor incidência de declínio cognitivo (decréscimo de nove pontos no 3MS - Mini Exame do estado Mental modificado) no grupo com maior gasto energético comparado ao de menor gasto (OR 0,09, IC 0,01-0,79).

Numa possível explicação da relação da dinâmica dos telômeros com estes achados, **Botha et al. (2012)** estudando ratos, referem que a exposição a eventos adversos precoces pode resultar no desenvolvimento de psicopatologia, frequentemente associada a alteração cognitiva. Segundo os autores este fato pode se dever a um acelerado envelhecimento celular relacionado à atrição dos telômeros. Neste caso, o exercício poderia acelerar a neurogênese, funcionando como um tampão ao efeito do estresse psicológico no comprimento do telômero. Por outro lado, **Bendix et al. (2011)**, estudando gêmeos dinamarqueses maiores de 70 anos não encontraram relação entre o tamanho do telômero e o desempenho cognitivo encontrando, no entanto, relação clara entre o tamanho do telômero e o desempenho físico.

Apesar de não termos, na presente amostra, encontrado correlação entre cognição (MEEM) e comprimento dos telômeros (**Tabela 5**), pudemos observar nítida relação, na comparação de médias entre grupos, entre os dados de cognição e o nível de atividade física (**Tabela 3**), confirmando os efeitos benéficos deste tipo de intervenção.

A resposta à nossa mais significativa questão (qual a participação da atividade física na medida dos telômeros e, portanto, do padrão de

envelhecimento celular?) exigiu a investigação de correlação entre o grau de atividade física e a medida dos telômeros dos linfócitos T.

Desta forma, o aspecto central no presente estudo refere-se à relação da medida de telômeros e atividade física em idosos. Trata-se de dado de obtenção trabalhosa pelos múltiplos passos de sua metodologia e pela medida em si (**Anexo 6**). É evidente que com uma amostra relativamente pequena, que apenas nos permite inferir diferenças entre os grupos polares (sedentários-atletas) estávamos preparados para resultados limitados; no entanto ao se analisar os dados referentes às medidas de telômeros por pares de bases nos linfócitos CD8 28-, sabidamente a célula mais relacionada ao envelhecimento (**Semba et al., 2005**), pudemos encontrar diferença significativa ($p=0,034$) quando se consideram os grupos polares: atletas e sedentários (**Tabela 4**).

Ao se fazer uma avaliação da literatura, diversos pesquisadores ressaltam a significância da medida dos telômeros como um marcador de envelhecimento, ligando-a principalmente às medidas de atividade física.

LaRocca et al. (2010), para determinar se a redução etária do TL está relacionada a atividade habitual de capacidade aeróbica máxima (VO_{2max}) e resistência estudaram grupos de sedentários e atletas (jovens e idosos). O comprimento do telômero em leucócitos (LTL) foi menor nos idosos sedentários em comparação com os jovens ($p<0,01$). O LT dos idosos treinados tiveram LT maiores que seus pares sedentários ($p<0,01$) e não foram diferentes dos jovens treinados (0,12). O LTL esteve positivamente relacionado ao VO_{2MAX} em adultos idosos. A regressão múltipla revelou que o VO_{2MAX} foi o único preditor independente do LTL no grupo como um todo; possivelmente à custa da telomerase (**Ornish et al., 2008**). Em nosso estudo a correlação de

Spearman não identificou significância entre a medida do VO₂MAX e o comprimento dos telômeros; talvez pelo número, ainda limitado, de casos estudados. No entanto quando estudamos a casuística através de comparação da média entre grupos, aplicando o teste de Kruskal-Wallis, a relação positiva entre atividade física e medida do telômero nos linfócitos CD8CD28- ficou patente, quando comparados os grupos extremos (sedentário e atleta), não sendo significativa para comparações com o grupo intermediário, possivelmente por uma limitação de casuística.

Um dado que nos parece relevante é o de que mesmo estudos realizados em telômeros de músculos em idosos mostram que o VO₂max está positivamente associado com o comprimento do telômero sugerindo que treinamento prolongado de resistência pode prover efeito protetivo no comprimento do telômero de células musculares (**Collins et al., 2003; Kadi et al., 2008; Østhus et al., 2012**). Este dado nos indica que, em concordância com **Ahmad et al. (2012)**, os dados vindos de exames com células de sangue periférico, como o nosso, de mais fácil e segura aquisição são aplicáveis às células musculares e, portanto nas pesquisas sobre envelhecimento musculoesquelético. Este dado vem confirmar achado descrito na literatura recente sobre os benefícios da atividade física na medida dos telômeros, possivelmente o melhor mais sofisticado marcador de saúde celular e de qualidade de envelhecimento, também no aparelho osteomuscular.

7 CONCLUSÕES

1. A medida da atividade física obtida por questionário IPAQ mostrou-se comparável a medida por VO2MAX, sendo, pois uma alternativa em estudos e condutas;
2. Comprovou-se diferença estatística entre a medida do telômeros em linfócitos e CD8CD28- bem como na cognição e a atividade física;
3. A programação da atividade física é intervenção em potencial de prevenção, melhora ou reversão de limitações funcionais em idosos particularmente nos idosos.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – Atividades Básicas de Vida Diária

- Tomar banho
- Vestir-se
- Fazer o toalete
- Transferência de local
- Continência dos esfíncteres
- Alimentar-se sozinho

Fonte: Katz et al., 1963

ANEXO 2 – Atividades Instrumentais de Vida Diária

- Usar o telefone
- Deslocar-se (táxi, ônibus, automóvel)
- Fazer compras
- Preparar refeições
- Fazer os trabalhos de casa
- Administrar as próprias medicações
- Gerenciar o dinheiro

Fonte: Fillenbaum et al., 1985

ANEXO 3 – Escala de Depressão Geriátrica de Yesavage – versão reduzida (GDS-15).

1. Você está satisfeito com a sua vida? (não)
2. Você deixou de lado muitos de suas atividades e interesses? (sim)
3. Você sente que sua vida está vazia? (sim)
4. Você sente-se aborrecido com frequência? (sim)
5. Está você de bom humor na maioria das vezes? (não)
6. Você teme que algo de ruim lhe aconteça? (sim)
7. Você se sente feliz na maioria das vezes? (não)
8. Você se sente frequentemente desamparado? (sim)
9. Você prefere permanecer em casa do que sair e fazer coisas novas? (sim)
10. Você sente que tem mais problemas de memória que antes? (sim)
11. Você pensa que é maravilhoso estar vivo? (não)
12. Você se sente inútil? (sim)
13. Você se sente cheio de energia? (não)
14. Você sente que sua situação é sem esperança? (sim)
15. Você pensa de que a maioria das pessoas estão melhores do que você?
(sim)

0= quando resposta for diferente do exemplo do parênteses/ 1= quando resposta for igual ao exemplo do parênteses/ Contagem máxima de GDS = 15/ Total > 5 = suspeita de depressão.

Fonte: Fountoulakis et al., 1999; Almeida & Almeida, 1999

ANEXO 4 – Mini-exame do estado mental

MINI-EXAME DO ESTADO MENTALBrucki SMD e cols. Sugestões para o uso do Mini-Exame do Estado Mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(3-B):777-781

Orientação Temporal	/ 5
<input type="checkbox"/> Que dia é hoje? <input type="checkbox"/> Em que mês estamos? <input type="checkbox"/> Em que ano estamos? <input type="checkbox"/> Em que dia da semana estamos? <input type="checkbox"/> Qual a hora aproximada? (considere a variação de mais ou menos uma hora)	
Orientação Espacial	/ 5
<input type="checkbox"/> Em que local nós estamos? (apontando para o chão: consultório, dormitório, sala) <input type="checkbox"/> Que local é este aqui? (apontando ao redor num sentido mais amplo: hospital, casa de repouso, própria casa). <input type="checkbox"/> Em que bairro nós estamos ou qual o nome de uma rua próxima? <input type="checkbox"/> Em que cidade nós estamos? <input type="checkbox"/> Em que Estado nós estamos?	
Memória Imediata	/ 3
Eu vou dizer três palavras e você irá repeti-las a seguir: <input type="checkbox"/> carro, <input type="checkbox"/> vaso, <input type="checkbox"/> tijolo Um ponto para cada palavra certa repetida na primeira vez, embora possa repeti-las até três vezes para o aprendizado.	
Cálculo	/ 5
Subtração de setes seriadamente: <input type="checkbox"/> 100-7, <input type="checkbox"/> 93-7, <input type="checkbox"/> 86-7, <input type="checkbox"/> 79-7, <input type="checkbox"/> 72-7 Se houver erro, corrija-o e prossiga. Considere correto se o examinado se auto-corrige.	
Evocação das Palavras	/ 3
Pergunte quais as palavras que o sujeito acabara de repetir: <input type="checkbox"/> carro, <input type="checkbox"/> vaso, <input type="checkbox"/> tijolo	
Nomeação	/ 2
Peça para o sujeito nomear dois objetos mostrados: <input type="checkbox"/> relógio, <input type="checkbox"/> caneta	
Repetição	/ 1
Vou lhe dizer uma frase e quero que você repita depois de mim: "Nem aqui, nem ali, nem lá". Dê um ponto somente se a repetição for perfeita.	
Comando	/ 3
<input type="checkbox"/> Pegue este papel com a mão direita, <input type="checkbox"/> dobre-o ao meio e <input type="checkbox"/> coloque-o no chão Se o sujeito pedir ajuda no meio da tarefa não dê dicas.	
Leitura	/ 1
Mostre a frase escrita "FECHÉ OS OLHOS" e peça para o indivíduo fazer o que está sendo mandado. Não auxilie se pedir ajuda ou se só ler a frase sem realizar o comando.	
Frase	/ 1
Peça ao indivíduo para escrever uma frase. Se não compreender, ajude com: "alguma frase que tenha começo, meio e fim; alguma coisa que aconteceu hoje; alguma coisa que queira dizer". Não são considerados erros gramaticais ou ortográficos.	
Cópia do Desenho	/ 1
Mostre o modelo e peça para fazer o melhor possível. Considere apenas se houver 2 pentágonos interseccionados formando uma figura de quatro lados.	
TOTAL	/ 30

• **Escores de Corte para Diagnóstico de Demência**Consenso da Academia Brasileira de Neurologia para Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil (*Arq Neuropsiquiatr* 2005;63(3-A):713-9)

Escolaridade	Corte	Sensibilidade	Especificidade	Referência
Analfabetos	19/20 (caso/não caso)	80%	71%	<i>Arq Neuropsiquiatr</i> 1998;56:605-612
Alfabetizados	23/24 (caso/não caso)	77,8%	75,4%	<i>Arq Neuropsiquiatr</i> 1998;56:605-612
Escolaridade ≥ 8 anos	26/27 (caso/não caso)	80%	95,6%	<i>Arq Neuropsiquiatr</i> 1994;52:1-7

• **Escores de Corte para Rastreamento de Demência**Consenso da Academia Brasileira de Neurologia para Diagnóstico de Doença de Alzheimer no Brasil (*Arq Neuropsiquiatr* 2005;63(3-A):713-9)

⇒ Sugerimos o uso de outros instrumentos para confirmação de perda cognitiva em indivíduos com escores abaixo das médias e/ou medianas obtidas na adaptação publicada em 2003 por Brucki e cols.

Escores de MEEM em pacientes com idade igual ou superior a 65 anos (*Arq Neuropsiquiatr* 2003;61(3-B):777-781)

Escolaridade	Estudo Hospitalar		Estudo Populacional	
	Média	Mediana	Média	Mediana
Analfabetos	19,73 (3,03)	20	18,81 (2,96)	20
0 a 4 anos	24,68 (2,88)	25	24,85 (3,03)	25
5 a 8 anos	26,86 (2,85)	27	26,57 (1,51)	27
9 a 11 anos	26,86 (3,24)	29	28,75 (1,26)	29
12 anos ou mais	29,25 (0,50)	29	27,17 (1,94)	28

Fonte: Brucki et al., 2003

ANEXO 5 – Questionário Internacional de Atividade Física – Versão Curta


**QUESTIONÁRIO INTERNACIONAL DE ATIVIDADE FÍSICA –
VERSÃO CURTA -**

Nome: _____
Data: ____/____/____ Idade: ____ Sexo: F () M ()

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

Para responder as questões lembre que:

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

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

1a Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por **pelo menos 10 minutos contínuos** em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

1b Nos dias em que você caminhou por **pelo menos 10 minutos contínuos** quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

2a. Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar

moderadamente sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

2b. Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por **pelo menos 10 minutos contínuos**, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

3a Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou covocar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias ____ por **SEMANA** () Nenhum

3b Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por **pelo menos 10 minutos contínuos** quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: ____ Minutos: ____

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

4a. Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

____ horas ____ minutos

4b. Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

____ horas ____ minutos

Sedentário - Não realiza nenhuma atividade física por pelo menos 10 minutos contínuos durante a semana;

Insuficientemente Ativo - Consiste em classificar os indivíduos que praticam atividades físicas por pelo menos 10 minutos contínuos por semana, porém de maneira insuficiente para ser classificado como ativos. Para classificar os indivíduos nesse critério, são somadas a duração e a frequência dos diferentes tipos de atividades (caminhadas + moderada + vigorosa). Essa categoria divide-se em dois grupos:

Insuficientemente Ativo A - Realiza 10 minutos contínuos de atividade física, seguindo pelo menos um dos critérios citados: frequência - 5 dias/semana ou duração - 150 minutos/semana;

Insuficientemente Ativo B - Não atinge nenhum dos critérios da recomendação citada nos indivíduos insuficientemente ativos A;

Ativo - Cumpra as seguintes recomendações: a) atividade física vigorosa - ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 minutos/sessão; b) moderada ou caminhada - ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 minutos/sessão; c) qualquer atividade somada: ≥ 5 dias/semana e ≥ 150 min/semana;

Muito Ativo - Cumpra as seguintes recomendações: a) vigorosa - ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão; b) vigorosa - ≥ 3 dias/semana e ≥ 20 min/sessão + moderada e ou caminhada ≥ 5 dias/semana e ≥ 30 min/sessão.

Fonte: Craig et al., 2003.

ANEXO 6 - Técnica de Medida dos Telômeros

Foram coletados cerca de 50 ml de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo, em tubo estéril contendo heparina como anticoagulante. As amostras foram processadas para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC – peripheral blood mononuclear cells) 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 – brake3 (Beckman Model J-6B centrifuge, USA). O anel de células mononucleares foi recolhido e as células foram lavadas em solução salina por duas vezes, removendo-se o sobrenadante após centrifugação em velocidade de 100 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então resuspensas 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 CellDyn 1400 USA). A viabilidade celular foi realizada pela adição de Azul de Trypan, considerando a viabilidade celular mínima acima de 90%.

Cultura de PBMC para avaliação de linfócitos e secreção de citocinas

A suspensão de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtida através de gradiente de Ficoll-Hypaque de sangue periférico heparinizado foi cultivada em placas de 96 alvéolos (Costar, USA) em volume de 0,1ml, contendo $2,5 \times 10^5$ de células, em meio RPMI 1640, enriquecido a 10% de soro AB humano (Sigma, Steinheim, Alemanha), e suplementado de gentamicina (10 mg/mL, Novafarma, SP, BR). Estas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ por períodos de 6-7 dias. Estímulos de Fitohemaglutinina (PHA, 2,5 mg/mL; Gibco BRL, NY, USA), Candida albicans (CMA, 10ug/mL; Pharmacia) e/ou Citomegalovírus (CMV, doado pelo laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP - IMT)

foram adicionados aos alvéolos em volumes de 0,1 ml/alvéolo. Dezoito horas antes do término do cultivo, as culturas foram pulsadas com timidinatriada (AmershamInternational, UK, 1uCi/alvéolo) e as culturas aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Mach II, Tomtek) em membranas de nitrocelulose (FlowLaboratories). A radioatividade incorporada foi medida em contador Betaplate 1205 (Wallac) e o resultado apresentado em média aritmética de triplicatas de alvéolos estimulados menos média aritmética de alvéolos não estimulados, por expressar de forma mais consistente e discriminativa os resultados.

Dosagem de citocinas IL-10, IL-2, TNF-alfa e IFN-gama

Para a dosagem de IL-2, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama em sobrenadantes de cultura, PBMC's foram cultivadas da mesma forma descrita acima, na presença dos estímulos especificados e meio de cultura somente (controle), em volume final de 1,0 ml em placas de 24 alvéolos. Os sobrenadantes e células foram coletados com 24 horas para dosagem de IL-2 e TNF-alfa e 120 horas de cultivo para as citocinas IL-10 e INF-gama. Os sobrenadantes foram centrifugados para eliminar debris celulares, aliquotados e conservados a -70°C até dosagem das citocinas. Para estas dosagens foram utilizados kits de ELISA comercialmente adquiridos, da marca R&D. Foram utilizados os procedimentos recomendados pelo fornecedor.

Separação Celular

Purificação de linfócitos TCD4+

A partir das PBMC's purificamos os linfócitos TCD4+ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD4 (CD4+ T CellIsolation Kit II human, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, 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%.

Purificação de linfócitos TCD4+ de memória (CD45RO+) e obtenção de linfócitos TCD4+ naive (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 Microbeadshuman, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, 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-), naive, 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 (Epics XL - Coulter), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico.

Purificação de linfócitos LTCD8+

A partir das PBMC's purificamos os linfócitos TCD8+ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD8 (CD8+ T CellIsolation Kit human, MiltenyiBiotec, 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-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 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, MiltenyeBiotec, 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%.

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 10µl para cada 10⁷ células. Posteriormente, as células foram marcadas com microesferas anti-PE na concentração de 20µl para cada 10⁷ células (CD28 Microbead Kit human, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, Alemanha). Após a passagem da solução contendo as células, a coluna foi retirada do campo magnético e as células de interesse (L TCD8+ CD28+) foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (LTCD8+ CD28-), também foram recolhidas.

Os linfócitos TCD8+ 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 (Epics XL - Coulter), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico.

Hibridização 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 Ruferet al., em 1998. A hibridização 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, conforme item 4.4, foram centrifugados e o sobrenadante foi desprezado, as células resuspensas 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 na concentração de 0,3 mg/ml ou o equivalente em água deionizada como controle negativo. O volume da solução de hibridização foi de 100 ml/ 105 células. As amostras foram aquecidas a 80°C por 10 minutos para desnaturação, seguida de hibridização a temperatura ambiente por 2 horas ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de solução tampão contendo 70% de formamida deionizada, 10 mM TRIS, 0,1% de BSA e 0,1% de Tween-20 (3000 rpm, 7 min 16°C) e uma vez com PBS 0,1% de BSA e 0,1% de Tween-20(2000 rpm, 5min). Após a lavagem as células foram resuspensas em 300 ml de PBS 0,1% de BSA contendo 10mg/ml de RNase A e incubadas overnight a 4°C. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (Epics XL - Coulter). A determinação do comprimento dos telômeros foi realizada de acordo com Batliwalla et al., 2000, e Ruffer et al., 1998.

Aquisição e análise dos dados

A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo (Epics XL - Coulter), após a hibridização in situ por fluorescência, de acordo com as instruções do fabricante (Telomere PNA Kit/FITC). Para tal, utilizamos FL1, em escala logarítmica, para a probe fluorescente do telômero e FL3, em escala linear, para a marcação do DNA. Os valores de MFI foram utilizados para medir o comprimento do telômero. A análise dos dados foi realizada através dos Softwares Summit versão 4.0 (Dako, Glostrup, Denmark) e Prism versão 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

A medida dos telômeros foi expressa em pares de bases (bp) = par de bases (inglês base pair). Um bp corresponde a aproximadamente 3.4 Å o de comprimento ao longo da cadeia.

Padronização da Técnica de Flow-FISH

Em estudo anterior, realizamos a padronização da técnica de Flow-FISH utilizando a subpopulação linfocitária TCD4⁺ CD45RO⁺ em 13 indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias (18 a 85 anos).

A padronização da técnica empregou o Telomere PNA Kit/FITC em linfócitos T CD4+CD45RO+ (memória). O primeiro ensaio foi realizado com dois indivíduos saudáveis, do sexo masculino, sendo um jovem na faixa etária de 24 anos e outro com 66 anos de idade, com objetivo de elucidar o processo natural de senescência celular, evidenciado pela redução do comprimento do telômero, com o avanço da idade. Os valores de MFI foram utilizados para medir o comprimento do telômero dos indivíduos

riférico 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 – brake3 (Beckman Model J-6B centrifuge, USA). O anel de células mononucleares foi recolhido e as células foram lavadas em solução salina por duas vezes, removendo-se o sobrenadante após centrifugação em velocidade de 100 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então resuspensas 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 CellDyn 1400 USA). A viabilidade celular foi realizada pela adição de Azul de Trypan, considerando a viabilidade celular mínima acima de 90%.

Cultura de PBMC para avaliação de linfócitos e secreção de citocinas

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 96 alvéolos (Costar, USA) em volume de 0,1ml, contendo $2,5 \times 10^5$ de células, 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 6-7 dias. Estímulos de Fitohemaglutinina (PHA, 2,5 µg/mL; Gibco BRL, NY, USA), *Candida albicans* (CMA, 10µg/mL; Pharmacia) e/ou Citomegalovírus (CMV, doado pelo laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP - IMT) foram adicionados aos alvéolos em volumes de 0,1 ml/alvéolo. Dezoito horas antes do término do cultivo, as culturas foram pulsadas com timidinatrítida (Amersham International, UK, 1uCi/alvéolo) e as culturas aspiradas com auxílio de coletor de células automático (Mach II, Tomtek) em membranas de nitrocelulose (Flow Laboratories). A radioatividade incorporada foi medida em contador Betaplate 1205 (Wallac) e o resultado apresentado em média aritmética de triplicatas de alvéolos estimulados menos média aritmética de alvéolos não estimulados, por expressar de forma mais consistente e discriminativa os resultados.

Dosagem de citocinas IL-10, IL-2, TNF-alfa e IFN-gama

Para a dosagem de IL-2, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama em sobrenadantes de cultura, PBMC's foram cultivadas da mesma forma descrita acima, na presença dos estímulos especificados e meio de cultura somente (controle), em volume final de 1,0 ml em placas de 24 alvéolos. Os sobrenadantes e células foram coletados com 24 horas para dosagem de IL-2 e TNF-alfa e 120 horas de cultivo para as citocinas IL-10 e IFN-gama. Os sobrenadantes foram centrifugados para eliminar debris celulares, aliquotados e conservados a -70°C até dosagem das citocinas. Para estas dosagens foram utilizados kits de ELISA comercialmente adquiridos, da marca R&D. Foram utilizados os procedimentos recomendados pelo fornecedor.

Separação Celular

Purificação de linfócitos TCD4+

A partir das PBMC's 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, MiltenyeBiotec, 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%.

Purificação de linfócitos TCD4+ de memória (CD45RO+) e obtenção de linfócitos TCD4+ naive (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 Microbeadshuman, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, 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-), naive, 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 (Epics XL - Coulter), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico.

Purificação de linfócitos LTCD8+

A partir das PBMC's purificamos os linfócitos TCD8+ por meio de seleção magnética negativa de células expressando a molécula CD8 (CD8+ T CellIsolation Kit human, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, 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%.

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, MiltenyiBiotec, 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, MiltenyeBiotec, Alemanha). Após a passagem da solução contendo as células, a coluna foi retirada do campo magnético e as células de interesse (L TCD8+ CD28+) foram recolhidas. As células filtradas pela coluna magnética (LTCD8+ CD28-), também foram recolhidas.

Os linfócitos TCD8+ 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 (Epics XL - Coulter), com compensação a partir de células marcadas apenas com controle isotópico.

Hibridização 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 Ruferet al., em 1998. A hibridização 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, conforme item 4.4, foram centrifugados e o sobrenadante foi desprezado, as células resuspensas 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 na concentração de 0,3 µg/ml ou o equivalente em água deionizada como controle negativo. O volume da solução de hibridização foi de 100 µl/ 105 células. As amostras foram aquecidas a 80°C por 10 minutos para desnaturação, seguida de hibridização a temperatura ambiente por 2 horas ao abrigo da luz. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com 1 ml de solução tampão contendo 70% de formamida deionizada, 10 mM TRIS, 0,1% de BSA e 0,1% de Tween-20 (3000 rpm, 7 min 16°C) e uma vez com PBS 0,1% de BSA e 0,1% de Tween-20(2000 rpm, 5min). Após a lavagem as células foram resuspendidas em 300 µl de PBS 0,1% de BSA contendo 10µg/ml de RNase A e incubadas overnight a 4°C. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo (Epics XL - Coulter). A determinação do comprimento dos telômeros foi realizada de acordo com Batiwalla et al., 2000, e Ruffer et al., 1998.

Aquisição e análise dos dados

A aquisição dos dados foi feita em citômetro de fluxo (Epics XL - Coulter), após a hibridização in situ por fluorescência, de acordo com as instruções do fabricante (Telomere PNA Kit/FITC). Para tal, utilizamos FL1, em escala logarítmica, para a probe fluorescente do telômero e FL3, em escala linear, para a marcação do DNA. Os valores de MFI foram utilizados para medir o comprimento do telômero. A análise dos dados foi realizada através dos Softwares Summit versão 4.0 (Dako, Glostrup, Denmark) e Prism versão 5.0 (GraphPad Software inc., CA, EUA).

A medida dos telômeros foi expressa em pares de bases (bp) = par de bases (inglês base pair). Um bp corresponde a aproximadamente 3.4 Å o de comprimento ao longo da cadeia.

Padronização da Técnica de Flow-FISH

Em estudo anterior, realizamos a padronização da técnica de Flow-FISH utilizando a subpopulação linfocitária TCD4+ CD45RO+ em 13 indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias (18 a 85 anos).

A padronização da técnica empregou o Telomere PNA Kit/FITC em linfócitos T CD4+CD45RO+ (memória). O primeiro ensaio foi realizado com dois indivíduos sadios, do sexo masculino, sendo um jovem na faixa etária de 24 anos e outro com 66 anos de idade, com objetivo de elucidar o processo natural de senescência celular, evidenciado pela redução do comprimento do telômero, com o avanço da idade. Os valores de MFI foram utilizados para medir o comprimento do telômero dos indivíduos.

9 REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Abbott RD, White LR, Ross GW, Masaki KH, Curb JD, Petrovitch H. Walking and dementia in elderly men. *JAMA*. 2004;292(12):1447-53.

Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104(3):183-90.

Ahmad S, Heraclides A, Sun Q, Elgzyri T, Rönn T, Ling C, et al. Telomere length in blood and skeletal muscle in relation to measures of glycaemia and insulinaemia. *Diabet Med*. 2012;29(10):e377-81.

Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr Soc*. 2003; 51(1):116-22.

Almeida OP, Almeida SA. Confiabilidade da versão brasileira da escala de depressão em geriatria (GDS) versão reduzida. *Arq Neuropsiquiatr*. 1999;57(2B):421-6.

Baerlocher GM, Roth A, Lansdorp PM. Telomeres in hematopoietic stem cells. *Ann NY Acad Sci*. 2003;996:44-8.

Barnes DE, Yaffe K, Satariano WA, Tager IB. A longitudinal study of cardiorespiratory fitness and cognitive function in healthy older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2003;51(4):459-65.

Bendix L, Gade MM, Staun PW, Kimura M, Jeune B, Hjelmborg JV, et al. Leukocyte telomere length and physical ability among Danish twins age 70+. *Mech Ageing Dev.* 2011;132(11-12):568-72.

Botha M, Grace L, Bugarith K, Russell VA, Kidd M, Seedat S, et al. The impact of voluntary exercise on relative telomere length in a rat model of developmental stress. *BMC Res Notes.* 2012;5:697.

Brucki SM, Nitrini R, Caramelli P, Bertolucci PH, Okamoto IH. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61(3B):777-81.

Ciconelli RM, Ferraz MB, Santos W, Meinão I, Quaresma MR. Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36. *Rev Bras Reumatol.* 1999; 39(3):143-50.

Collins M, Renault V, Grobler LA, St Clair Gibson A, Lambert MI, Wayne Derman E, et al. Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(9):1524-8.

Comfort A. The myth of senility. Diagnosing nonspecific major illness in the elderly. *Postgrad Med.* 1979;65(3):130-42.

Craig CL, Marshall AL, Sjostrom M, Bauman A, Booth ML, Ainsworth BE, Pratt M, Ekelund U, Yngve A, Sallis JF, Oja P. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(8):1381-95.

Fillenbaum GG. Screening the elderly. A brief instrumental activities of daily living measure. *J Am Geriatr Soc.* 1985;33(10):698-706.

Fountoulakis KN, Tsolaki M, Iacovides A, Yesavage J, O'Hara R, Kazis A, et al. The validation of the short form of the Geriatric Depression Scale (GDS) in Greece. *Aging (Milano).* 1999;11(6):367-72.

Freitas EV, Py L, editores. *Tratado de geriatria e gerontologia.* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC, Carroll SB. *Introdução à genética.* 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.

Hazzard W, Blass J, Halter J, Ouslander J, Tinetti M, editors. *Principles of geriatric medicine & gerontology.* 5ed. Nova York: McGraw-Hill Education; 2003.

Hovatta I, de Mello VD, Kananen L, Lindström J, Eriksson JG, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Peltonen M, Tuomilehto J, Uusitupa M. Leukocyte telomere length in the finnish diabetes prevention study. *PLoS One*. 2012;7(4):e34948.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Projeção da população do Brasil por sexo e idade: 1980-2050*. Rio de Janeiro: IBGE; 2010.

Jugdutt BI. Prevention of heart failure in the elderly: when, where and how to begin? *Heart Fail Rev*. 2012;17(4-5):531-44.

Kadi F, Ponsot E, Piehl-Aulin K, Mackey A, Kjaer M, Oskarsson E, et al. The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*. 2008;40(1):82-7.

Katz S, Ford AB, Moskowitz RW, Jackson BA, Jaffe MW. Studies of illness in the aged. the index of adl: a standardized measure of biological and psychosocial function. *JAMA*. 1963;185:914-9.

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;131(2):165-7.

Larson EB, Wang L, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Crane P, et al. Exercise is associated with reduce risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. *Ann Intern Med.* 2006;144(2):73-81.

Middleton LE, Manini TM, Simonsick EM, Harris TB, Barnes DE, Tylavsky F, et al. Activity energy expenditure and incident cognitive impairment in older adults. *Arch Intern Med.* 2011;171(14):1251-7.

Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Lundin S, Roos G, Nilsson PM. Increased abdominal obesity, adverse psychosocial factors and shorter telomere length in subjects reporting early ageing; the MONICA Northern Sweden Study. *Scand J Public Health.* 2008;36(7):744-52.

Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, et al. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol.* 2008;9(11):1048-57.

Østhus IB, Sgura A, Berardinelli F, Alsnes IV, Brønstad E, Rehn T, et al. Telomere length and long-term endurance exercise: does exercise training affect biological age? A pilot study. *PLoS One.* 2012;7(12):e52769.

Pfister G, Weiskopf D, Lazuardi L, Kovaiou RD, Cioca DP, Keller M, et al. Naive T cells in the elderly: are they still there? *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1067:152-7.

Rubenstein LZ, Harker JO, Salva A, Guigoz Y, Vellas B. Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini nutritional assessment (MNA-SF). *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(6):M366-72.

Rufer N, Brummendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory t cells in early childhood. *J Exp Med.* 1999;190:157-67.

Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, et al. Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA.* 2009;302(6):627-37.

Semba RD, Margolick JB, Leng S, Walston J, Ricks MO, Fried LP. T cell subsets and mortality in older community-dwelling women. *Exp Gerontol.* 2005;40(1-2):81-7.

Senchina DS, Kohut ML. Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging.* 2007;2(1):3-16.

Shioi T, Inuzuka Y. Aging as a substrate of heart failure. *J Cardiol.* 2012;60(6):423-8.

Slagboom PE, Droog S, Boomsma D. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet.* 1994;55(5):876-82.

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009;22(11):1041-50.

Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, Scharhag J, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation.* 2009;120(24):2438-47.

Wolkowitz OM, Reus VI, Mellon SH. Of Sound mind and body: depression, disease and accelerated aging- Dialogues *Clin Neurosci.* 2011;13(1):25-39.

Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M, et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res.* 1982-1983;17(1):37-49.

10 BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Archer T, Kostrzewa RM. Physical exercise alleviates health defects, symptoms, and biomarkers in schizophrenia spectrum disorder. *Neurotox Res*. 2015 Jul 15. [Epub ahead of print].

Batliwalla FM, Damle RN, Metz C, Chiorazzi N, Gregersen PK. Simultaneous flow cytometric analysis of cell surface markers and telomere length: analysis of human tonsillar B cells. *J Immunol Methods*. 2001;247(1-2):103-9.

Borghini A, Giardini G, Tonacci A, Mastorci F, Mercuri A, Sposta SM, et al. Chronic and acute effects of endurance training on telomere length. *Mutagenesis*. 2015 May 22. [Epub ahead of print].

Callegari-Jacques SM. *Bioestatística. Princípios e Aplicações*. Porto Alegre: Artmed; 2003; 84-93.

Effros RB. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol*. 2011;46(2-3):135-40.

Hair JF Jr, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Multivariate data analysis*. New Jersey: Prentice Hall; 1998.

Hernandez SS, Coelho FG, Gobbi S, Stella F. Effects of physical activity on cognitive functions, balance and risk of falls in elderly patients with Alzheimer's dementia. *Rev Bras Fisioter.* 2010;14(1):68-74.

Jardim LB, Ashton-Prolla P, Maluf SW. Prêmio Nobel de fisiologia e medicina 2009: o papel dos telômeros e da telomerase na manutenção dos cromossomos. *Rev HCPA.* 2009;29(3):271-5.

Katschinski DM, Neustock P, Klüter H, Kirchner H. Influence of Various Factors on Interferon- γ Production in Cultures of Human Leukocytes. *J Interferon Res.* 1994;14(3):105-10.

Kosciolek BA, Rowley PT. Human lymphocyte telomerase is genetically regulated. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;21(2):124-30.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia celular e molecular.* 4ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.

Loprinzi PD. Cardiorespiratory capacity and leukocyte telomere length among adults in the United States. *Am J Epidemiol.* 2015;182(3):198-201.

Miller RA. Biomarkers of aging: prediction of longevity by using age-sensitive T-cell subset determinations in a middle-aged, genetically heterogeneous mouse population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(4):B180-6.

Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H, Gregersen PK. Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol.* 1996;156(10):3587-90.

Mundstock E, Zatti H, Louzada FM, Oliveira SG, Guma FT, Paris MM, et al. Effects of physical activity in telomere length: systematic review and meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2015;22:72-80.

Nascimento CM, Pereira JR, Pires de Andrade L, Garuffi M, Ayan C, Kerr DS, et al. Physical exercise improves peripheral BDNF levels and cognitive functions in mild cognitive impairment elderly with different bdnf Val66Met genotypes. *J Alzheimers Dis.* 2015;43(1):81-91.

Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, Warren BJ, Dotson RC, Butterworth DE, et al. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(7):823-31.

Pardini R, Matsudo S, Araújo T, Matsudo V, Andrade E, Braggion G, et al. Validação do questionário internacional de nível de atividade física (IPAQ - versão 6): estudo piloto em adultos jovens brasileiros. *Rev Bras Ciên e Mov.* 2001;9(3): 45-51.

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.

Prado LKP. *Exercícios físicos em idosos: efeitos nos biomarcadores periféricos de neuroproteção* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Pucci GC, Rech CR, Fermino RC, Reis RS. Association between physical activity and quality of life in adults. *Rev Saude Publica*. 2012;46(1):166-79.

Rink L, Cakman I, Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev*. 1998;102(2-3):199-209.

Rocha MOC, Pedroso ERP, Santos AGR. *Infectologia geriátrica*. 3ed. São Paulo: Fundo Editorial BYK; 1997. p. 57-64.

Shinkai S, Kohno H, Kimura K, Komura T, Asai H, Inai R, et al. Physical activity and immune senescence in men. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27(11):1516-26.

Shinkai S, Konishi M, Shephard RJ. 1998. Aging and immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76(5):562-72.

Telomere PNA Kit/FIT, code K5327. 6th edition. Reino Unido: DAKO, 2007.

Available

from:

<http://www.yamasa.com/shindan/PDF/dako%20insert%20E/K5327->

[TelomerePNAKitFITC.pdf](#)

Todo-Bom A, Mota Pinto A, Alves V, Vale Pereira S, Santos Rosa M. Apoptosis and asthma in the elderly. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(2):107-12.

Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(24):11091-4.

Yaffe K, Barnes D, Nevitt M, Lui LY, Covinsky K. A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch Intern Med*. 2001;161(14):1703-8.

Zijlmans JM, Martens UM, Poon SS, Raap AK, Tanke HJ, Ward RK, et al. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(14):7423-8.