

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Programa de Mestrado em Ciências da Saúde

Eduardo Santos Felismino

**A MELHOR RESPOSTA À VACINAÇÃO CONTRA O
VÍRUS DA GRIPE EM IDOSOS FISICAMENTE
TREINADOS ESTÁ ASSOCIADA A REDUÇÕES DE
IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS PARA
CITOMEGALOVÍRUS, BEM COMO A MELHORIAS NOS
PERFIS INFLAMATÓRIOS E DE CÉLULAS TCD8+**

São Paulo
2021

Eduardo Santos Felismino

**A MELHOR RESPOSTA À VACINAÇÃO CONTRA O
VÍRUS DA GRIPE EM IDOSOS FISICAMENTE
TREINADOS ESTÁ ASSOCIADA A REDUÇÕES DE
IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS PARA
CITOMEGALOVÍRUS, BEM COMO A MELHORIAS NOS
PERFIS INFLAMATÓRIOS E DE CÉLULAS TCD8+**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade de Santo Amaro - UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. André Luis Lacerda Bachi

Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

**São Paulo
2021**

F358m Felismino, Eduardo Santos

A melhor resposta à vacinação contra o vírus da gripe em idosos fisicamente treinados está associada a reduções de imunoglobulinas específicas para citomegalovírus, bem como a melhorias nos perfis inflamatórios e de células tcd8+: Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade de Santo Amaro de São Paulo / Eduardo Santos Felismino. – São Paulo, 2021.

49 f.:il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientador(a): Prof^ª. Dr. André Luis Lacerda Bachi
Coorientador(a): Prof^ª. Dra. Carolina Nunes França

1. Vacina. 2 Citocinas. 3. Imunoglobulina. 4. Treinamento físico. 5. Envelhecimento. I. Bachi, André Luis Lacerda. II. França, Carolina Nunes, co-orient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

DEDICATÓRIAS

À minha mãe,

Nilza Helena Felismino, o meu alicerce, pois em todos os momentos desta vida, com seu amor incondicional, empreendeu esforços desmedidos nos mais diversos incentivos, apoiando todos os meus projetos. A senhora minha mãe, devo tudo!

À minha avó,

Ana Candida da Silva Garcia, por todo apoio, suporte e amor em forma de alimentação, afinal, comer faz crescer e impulsionar a vida, assim sendo, graças a sua dedicação, paciência e perseverança, me propiciou meios frente as mais diversas adversidades. A senhora deu base à toda família!

À meu irmão,

André Santos Felismino, por sempre incentivar, muito obrigado pelo apoio e dedicação. Logo mais estarei assistindo ao seu sucesso acadêmico!

AGRADECIMENTOS

À meu orientador,

Prof. Dr. **André Luís Lacerda Bachi**, agradeço a compreensão, confiança e pelo seu exemplo profissional, onde humildade pode sim fazer parte de quem é dotado de notável saber. Minha gratidão eterna por permitir dar um passo em benefício da humanidade!

À minha coorientadora,

Profa. Dra. **Carolina Nunes França**, carinhosamente "**Carol**", a coordenadora mais onipresente que tive a honra de conhecer, agradeço por ter me aceitado neste importante programa, onde a empolgação tomou conta do início ao fim. Exemplo de liderança visionária, democrática e carismática!

À minha colaboradora,

Natalia Barjud Moreira, agradeço todo seu empenho, eficiência e disposição em abraçar este projeto, pois, graças a você, meus caminhos percorridos se tornaram bem efetivos, ou seja, sem você, nada disso, a menos desta forma, não seria tão prazeroso. Serei grato para sempre e espero te retribuir neste ou em outro programa, pelo bem do mundo!

RESUMO

Introdução: Embora se suponha que a infecção crônica pelo citomegalovírus (CMV) possa ser um fator de destaque para o desenvolvimento da imunosenescência e, conseqüentemente, impactar negativamente na resposta imune contra a vacinação para o vírus Influenza em idosos, o papel da prática regular de exercícios físicos combinados (EFC) neste contexto é desconhecido.

Objetivo: Investigar como a prática regular de EFC está envolvida nas respostas de anticorpos específicos, não apenas para a vacina contra o vírus Influenza, mas também para a infecção pelo CMV em idosos. **Métodos:** Oitenta idosos (n=80), de ambos os sexos, foram recrutados e separados em dois grupos: não praticantes (NP, n=31, idade 74.1±6.4) e praticantes de um programa de EFC (n=49, idade 71,7±5,8) por, no mínimo, 12 meses. Ambos os grupos de voluntários foram submetidos à vacinação contra o vírus Influenza e amostras de sangue foram coletadas antes (pré) e 30 dias após a vacinação (pós).

Resultados: Em relação às respostas de anticorpos específicos para a vacinação contra o vírus Influenza, níveis séricos mais elevados de IgA foram encontrados no grupo EFC pós-vacinação do que pré-vacinação (p<0,01), enquanto níveis mais elevados de IgM foram observados tanto nos grupos NP (p<0,05) e EFC (p<0,001) pós-vacinação em comparação com os valores pré-vacinação. Além disso, os níveis séricos tanto de IgG para vacinação contra o vírus Influenza quanto de IgG específica para CMV, assim como de interleucina 6 (IL-6) e IL-10, permaneceram inalterados entre os tempos avaliados. No entanto, a razão entre os níveis de IL-10 e IL-6 (IL-10/IL-6) pós-vacinação foi maior (p<0,05) no grupo EFC do que os valores observados anteriormente à vacinação. Foram observadas correlações negativas entre os níveis de IgG específico para vacinação contra o vírus Influenza e CMV apenas no grupo EFC, tanto pré quanto pós-vacinação. Além desta, também foram encontradas correlações negativas entre IL-10 e IgG (IL-10/IgG) específicas para CMV em todos os grupos de voluntários pré e pós-vacinação, enquanto no grupo EFC foi observada uma correlação positiva entre IL-10 e IgG específico para vacinação contra o vírus Influenza pré e pós-vacinação. Além disso, pelo ensaio de inibição da hemaglutinação verificou-se que 32,6% do grupo EFC responderam a vacinação contra o vírus Influenza e apresentaram reduções no seroestado de CMV (p<0,05 e p <0,001, respectivamente) além de aumento nas células TCD8+ "naive" e efectoras pós-vacinação (p <0,01). No entanto, apenas os respondedores do grupo EFC mostraram reduções significativas na proporção de células TCD8+ efectoras para "naive" (p <0,05), com níveis aumentados de IL-10 pós-vacinação (p<0,001). Em suma, este estudo demonstrou que a melhora na resposta a vacinação contra o vírus Influenza em idosos soropositivos para CMV estava relacionada a um estado antiinflamatório e aumento de células TCD8+ virgens, particularmente associado à prática regular de EFC.

Palavras-chave: vacina, citocinas, imunoglobulina, treinamento físico, envelhecimento.

ABSTRACT

Introduction: Although it is supposed that chronic cytomegalovirus (CMV) infection may be a prominent factor in the development of immunosenescence and, consequently, negatively impact the immune response against vaccination for the Influenza virus in the elderly, the role of regular practice of Combined physical exercise (OBE) in this context is unknown. **Objective:** To investigate how regular OBE practice is involved in specific antibody responses, not only for the Influenza virus vaccine, but also for CMV infection in the elderly. **Methods:** Eighty elderly people (n=80), of both sexes, were recruited and separated into two groups: non-practitioners (NP, n=31, age 74.1±6.4) and practitioners of an OBE program (n =49, age 71.7±5.8) for at least 12 months. Both groups of volunteers underwent vaccination against the Influenza virus and blood samples were collected before (pre) and 30 days after vaccination (post). **Results:** Regarding specific antibody responses to vaccination against the Influenza virus, higher serum levels of IgA were found in the post-vaccination OBE group than pre-vaccination ($p<0.01$), while higher levels of IgM were observed both in the NP ($p<0.05$) and OBE ($p<0.001$) groups post-vaccination compared to pre-vaccination values. Furthermore, the serum levels of both IgG for vaccination against Influenza virus and IgG specific for CMV, as well as interleukin 6 (IL-6) and IL-10, remained unchanged between the times evaluated. However, the ratio between the levels of IL-10 and IL-6 (IL-10/IL-6) post-vaccination was higher ($p<0.05$) in the OBE group than the values observed before vaccination. Negative correlations were observed between specific IgG levels for vaccination against Influenza and CMV viruses only in the OBE group, both pre- and post-vaccination. In addition to this, negative correlations were also found between IL-10 and IgG (IL-10/IgG) specific for CMV in all groups of volunteers before and after vaccination, while in the OBE group a positive correlation was observed between IL-10 and Specific IgG for pre- and post-vaccination influenza virus vaccination. In addition, the hemagglutination inhibition assay showed that 32.6% of the CET group responded to vaccination against the Influenza virus and presented reductions in CMV serostatus ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively) in addition to an increase in “naive” TCD8+ cells and post-vaccination effector cells ($p < 0.01$). However, only responders in the OBE group showed significant reductions in the proportion of effector CD8+ cells to “naive” ($p<0.05$), with increased levels of IL-10 post-vaccination ($p<0.001$). In summary, this study demonstrated that the improvement in the response to vaccination against the Influenza virus in elderly seropositive for CMV was related to an anti-inflammatory state and an increase in virgin CD8+ T cells, particularly associated with the regular practice of OBE.

Keywords: vaccine, cytokines, immunoglobulin, physical training, aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma e design experimental do estudo

Figura 2. Análise por citometria de fluxo do perfil de células TCD8+ “naive” e efectoras. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram marcadas com anticorpos que reconhecem CD3, CD8, CD45RA, CD27 e CD197 e analisadas por citometria de fluxo.

Figura 3. Concentração sérica (média \pm DP) de IgG específico para citomegalovírus (CMV, A, UI/mL), e também dos anticorpos IgG (B), IgA (C) e IgM (D) específicos para o vírus *Influenza* (D.O. 450nm) nos grupos de voluntários idosos (não praticantes, NP e praticantes de exercícios físicos combinados, EFC), tanto antes (pré) quanto após 30 dias (pós) da vacinação. Nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 4. Concentração sérica (mediana e intervalo interquartil) de interleucina (IL) -6, IL-10 e a razão entre IL-10 e IL-6 (IL-10/IL-6) nos grupos de voluntários idosos (não praticantes - NP; praticantes de exercícios físicos combinados - EFC), tanto antes (pré) quanto após 30 dias (pós) da vacinação. Nível de significância de * $p < 0,05$.

Figura 5. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis de anticorpos séricos para CMV e IgA específico (A), IgM (B) e IgG (C) para VVI nos grupos de voluntários (NP e EFC), nos períodos pré e pós-vacinação. Nível de significância de * $p < 0,05$.

Figura 6. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis séricos de IL-6 e IgG específico para CMV

nos grupos de voluntários, pré- (NP - A e EFC - B) e pós-vacinação (NP - C e EFC - D), e entre IL-6 e IgG específico para VVI nos grupos de voluntários, pré- (NP - E e EFC - F) e pós-vacinação (NP - G e EFC - H). Nível de significância de $*p < 0,05$.

Figura 7. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis séricos de IL-10 e IgG específico para CMV nos grupos de voluntários, pré- (NP - A e EFC - B) e pós-vacinação (NP - C e EFC - D), e entre IL-10 e IgG específico para vacinação contra o vírus *Influenza* nos grupos de voluntários, pré- (NP - E e EFC - F) e pós-vacinação (NP - G e EFC - H). Nível de significância de $*p < 0,05$.

Figura 8. Comparação entre os respondentes e não respondentes dos não praticantes (NP) e praticantes de grupos de exercício físico combinado (EFC) para a vacinação contra o vírus da influenza (VVI) para IgG específica para citomegalovírus (CMV) (A) e níveis de IL-6 (B) e IL-10 (C), bem como “naive” (D), efetora (E) e a razão de células TCD8+ efector/”naive” pré e pós-vacinação. Em (D – F), os resultados dos que não responderam são apresentados em vermelho, enquanto os do respondente são apresentados em azul. $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas e antropométricas dos idosos grupos não praticantes (NP) e praticantes de um programa de exercícios físicos combinados (EFC).

LISTA DE SIGLAS

% - Porcentagem

< - Menor que

> - Maior que

ACSM – do inglês American College of Sports Medicine

1-RM – 1 repetição máxima

CAEE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CAME - Colégio Americano de Medicina Esportiva

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa

cm – Centímetros

CMV - Citomegalovírus

CV - Eventos Cardiovasculares

DCV - Doenças Cardiovasculares

EDTA - do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid

EFC – Exercício físico combinado

ELISA – do inglês Enzyme-Linked Immunosobent Assay

Fc-max - Frequência Cardíaca Máxima

IMC - Índice de Massa Corporal

M - Masculino

m² - Metro Quadrado

mg – Miligrama

ml – Mililitro

°C - Graus Celsius

SEME - Secretaria Municipal de Esportes

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

UNISA – Universidade Santo Amaro

VVI - Vacina Vírus *Influenza*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	14
2. OBJETIVO-----	18
2.1. Objetivo Geral-----	18
2.2. Objetivos específicos-----	18
3. METODOLOGIA-----	19
3.1. População e desenho do estudo-----	19
3.2. Avaliações Antropométricas, nutricionais, clínicas e de atividade física-----	20
3.3. Avaliação da composição corporal por bioimpedância-----	21
3.4. Avaliação do Nível Basal de Atividade Física-----	21
3.5. Programa de treinamento combinado-----	21
3.6. Vacinação contra o vírus da gripe-----	23
3.7. Coleta de Amostras de Sangue-----	23
3.8. Determinação da resposta de anticorpos específicos para a vacinação contra o vírus da gripe e CMV-----	23
3.9. Ensaio de inibição de hemaglutinação (IHA)-----	24
3.10. Determinação dos linfócitos TCD8+ “naive” e efetoras-----	24
3.11. Determinação de citocinas pró e anti-inflamatórias-----	26
3.12. Análise estatística-----	26
4. RESULTADOS-----	27
5. DISCUSSÃO-----	33
6. CONCLUSÃO-----	41
7. REFERÊNCIAS-----	42
ANEXOS-----	48
A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)-----	48
B – Termo de compromisso e confiabilidade-----	50
C - Formulário de Autorização para Pesquisa-----	51

1. INTRODUÇÃO

O termo envelhecimento ou senescência refere-se a um processo dinâmico e progressivo no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas, decorrentes da interação de uma série de variáveis como fatores genéticos, estilo de vida e doenças (1). Por isso, é muito importante estar preparado para vivê-la da melhor maneira possível (2).

Segundo definição da Organização Mundial de Saúde (OMS), indivíduos acima de sessenta e cinco anos são considerados idosos (3). Todavia, o Ministério da Saúde de nosso país considera idoso o indivíduo com sessenta anos de idade ou mais (4, 5). A literatura que aborda temas relacionados à terceira idade é unânime ao apontar um fenômeno que vem alterando de modo significativo o perfil da sociedade no que diz respeito ao envelhecimento progressivo da população mundial (6).

Neste sentido, dados apresentados pelas Nações Unidas mostram que, globalmente, em 2019, havia 703 milhões de indivíduos com idades acima de 65 anos, e isto representava que 1 em cada 11 indivíduos tinham mais de 65 anos. Com base nas estimativas, até 2050 haverá dois bilhões de idosos no mundo, o que proporcionará que 1 em cada 6 pessoas no mundo alcancem idades acima de 65 anos (7).

É amplamente aceito que o envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade (6). Neste sentido, todas as sociedades do mundo estão no meio desta revolução da longevidade, mesmo que algumas ainda estejam em estágios iniciais e outras mais avançadas. Assim, todos passarão por essa transição extraordinária, na qual a chance de atingir idades acima de 65 anos gira em torno de mais de 90% atualmente, especialmente em países com maior expectativa de vida.

De maneira semelhante a outros países, o Brasil tem apresentado evidente crescimento da população idosa e entre 2012 e 2017 o número de idosos cresceu 18%, ultrapassando 30 milhões de pessoas, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em 2020, nosso país ocupava o 122^o lugar no ranking dos países com o maior número de idosos entre seus habitantes (8).

Além disso, a expectativa média de vida do brasileiro deve aumentar dos atuais 75 anos para 81 anos, sendo que as mulheres continuarão vivendo mais

do que os homens com expectativa de vida de 84,4 anos para as mulheres, contra 78,03 para os homens. Em média, as mulheres vivem até os 78,5 anos, enquanto os homens até os 71,5 anos (5). Esses dados mostram que o ritmo de crescimento da população idosa no Brasil tem sido sistemático e consistente.

Dentre algumas questões relacionadas ao processo de envelhecimento, a redução das atividades imunológicas, fenômeno denominado imunosenescência, é considerada um fator corolário que leva a população idosa a apresentar diminuição das respostas imunes, inclusive as vacinais. Embora a vacinação seja uma intervenção segura e que, de forma geral, pode desencadear uma resposta imunológica protetora desde bebês até pessoas mais velhas, a literatura destaca que a imunogenicidade para a vacinação, principalmente para a vacina contra o vírus *Influenza (VVI)*, é influenciada negativamente pela idade, uma vez que em indivíduos de 50 a 54 anos, a eficácia da vacinação gira em torno de 52% versus 40% em indivíduos idosos com idade acima de 65 anos (9, 10).

Segundo a literatura, os vírus respiratórios estão intimamente associados a doenças graves na população idosa e, em particular, o vírus da gripe é a principal causa do aumento da hospitalização e morte devido à idade. Nesse sentido, é amplamente aceito que a campanha anual de vacinação para o vírus *Influenza*, principalmente para a população idosa, pode evitar, ou pelo menos minimizar, a gravidade dessa infecção (9).

Neste contexto, vale destacar que a imunossenescência compromete a resposta vacinal não apenas devido à redução de células T “naive” em associação ao acúmulo de células T efetoras e de memória, mas também em consequência do desenvolvimento de um outro fenômeno associado ao envelhecimento chamado de “inflammaging” (11, 12). De acordo com a literatura, o termo “inflammaging” relaciona-se à manifestação de uma inflamação crônica, sistêmica, estéril, de baixo grau, associada ao envelhecimento, na qual os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), estão aumentados, em contraste com a redução das citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (13). É de extrema importância ressaltar que a reativação da infecção pelo citomegalovírus (CMV), um herpes-vírus, pode estar envolvida e, assim, ser um essencial gatilho para o desencadeamento de processos inflamatórios, como o “inflammaging”.

A infecção por CMV geralmente ocorre durante a infância e, nesta fase, pode desencadear uma forte resposta imunológica. Infelizmente, essa resposta imune não é capaz de eliminar completamente o vírus, o que leva essa infecção a uma forma latente que persiste durante a vida (14, 15). Nesse caso, o CMV utiliza as células mielóides como seu principal reservatório e a resposta inflamatória do hospedeiro para perpetuar seu ciclo de vida, favorecendo assim sua manutenção no indivíduo durante a vida toda. Vale destacar que citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a reativação do vírus de seu estado de latência para uma situação de replicação viral ativa. Assim, os ciclos repetidos de reativação e replicação podem amplificar o estado pró-inflamatório sistêmico, principalmente em idosos (16, 17).

Além dessa associação proeminente entre infecção por CMV e resposta humoral e estado inflamatório, alterações na imunidade celular, particularmente uma redução na frequência de células TCD8+, são uma das principais marcas não só do envelhecimento, mas também da infecção por CMV. De acordo com a literatura, indivíduos com infecção latente por CMV frequentemente apresentam notável redução na frequência de células T “naive”, principalmente em células TCD8+ em comparação com células TCD4+, quando comparados a indivíduos sem infecção por CMV, independentemente da idade. Em contraste com essas reduções em células TCD8+ “naive”, indivíduos soropositivos para CMV apresentam elevações na frequência de células TCD8+ efetoras. Portanto, por esta característica estar intimamente associada à imunossenescência e latência do CMV, pode ter impacto na redução da resposta relacionada à idade na infecção pelo vírus influenza e sua vacinação (18, 19).

Corroborando estas informações, foi demonstrado que os títulos de anticorpos para CMV estão positivamente correlacionados com citocinas pró-inflamatórias sistêmicas. Interessantemente, também foi demonstrado que os títulos de anticorpos para CMV apresentam evidente correlação negativa com a resposta de anticorpos à vacina contra o vírus *Influenza*, preferencialmente em indivíduos idosos (20, 21).

Apesar da imunossenescência e da infecção pelo CMV serem dois fatores que podem comprometer profundamente a resposta vacinal, de certa forma, é consenso na literatura que certas intervenções, como a prática regular de exercícios físicos, mostram-se capazes de potencializar a resposta imunológica

e também regular o estado inflamatório sistêmico, o que leva a um aumento na imunogenicidade para vacinação, incluindo em pessoas idosas (22).

Neste sentido, cada dia mais tem sido pontuado que a prática regular de exercícios físicos pode beneficiar de maneira significativa os praticantes e, desta forma, minimizar os efeitos negativos do envelhecimento, levando ao envelhecimento bem-sucedido ou saudável (23). Segundo as determinações apresentadas pelo Colégio Americano de Medicina Esportiva (24), a combinação de exercícios físicos aeróbios e resistidos parece ser mais eficaz, do que qualquer forma de exercício físico sozinho, na redução dos efeitos prejudiciais de um estilo de vida sedentário sobre a saúde e o funcionamento do sistema imunológico em indivíduos idosos. Além disso, os exercícios combinados são capazes de otimizar a aquisição, manutenção e recuperação das qualidades físicas que foram perdidas no decorrer dos anos do envelhecimento (25).

Corroborando estas informações, nosso grupo tem demonstrado que idosos que praticam exercícios físicos regulares apresentam melhor resposta, tanto celular quanto humoral, à VVI quando comparados não apenas a idosos não praticantes de exercícios físicos, mas também àqueles com estilo de vida sedentário (12, 26, 27). Contudo, o impacto da soropositividade para o CMV neste contexto é pouco compreendido.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Investigar como a prática regular de exercícios físicos combinados influencia na modulação do perfil inflamatório sistêmico, bem como nas respostas de linfócitos TCD8+ e de anticorpos específicos para a vacina contra o vírus *Influenza* em idosos soropositivos para CMV em idosos.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar antes e após 30 dias da vacinação para o vírus *Influenza*:

- a resposta de anticorpos específicos (IgA, IgM e IgG) para VVI;
- a resposta de anticorpos específicos (IgG) para a infecção pelo CMV;
- o nível sistêmico das citocinas IL-6 e IL-10;
- a capacidade neutralizante dos anticorpos IgG para VVI;
- o número de linfócitos TCD8+ “naive” e efetores.

3. METODOLOGIA

3.1. População e desenho do estudo

O presente estudo configura-se do tipo prospectivo, intervencional, auto-controlado, aberto, com análise cega de desfechos, no qual foram utilizadas amostras células e de soro coletadas e armazenadas a -80°C nas dependências do Laboratório de Pesquisa da UNISA e ou da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Além disso, os dados antropométricos, de composição corporal, capacidade funcional, nível de atividade física e função muscular dos voluntários do presente estudo, já coletados, foram utilizados para caracterização dos grupos do estudo. Vale destacar que o número de voluntários foi estabelecido a partir do cálculo amostral realizado utilizando-se o programa G*Power.

Conforme demonstrado no fluxograma (Figura 1), participaram deste estudo 80 idosos (com idades entre 60 e 85 anos), tanto mulheres (n=62) quanto homens (n=18). A seleção e o recrutamento foram realizados pelo coordenador do Programa de Atenção Básica à Saúde da Pessoa Idosa que pertence a Disciplina de Geriatria e Gerontologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os voluntários participantes foram alocados em dois grupos: não praticantes (NP, N=31) e praticantes regulares de um programa de exercícios físicos combinados (EFC, n=49). A esse respeito, vale ressaltar que, durante o período do estudo, todos os voluntários mantiveram sua rotina habitual. Além disso, as amostras de sangue foram coletadas em dois momentos diferentes: antes (pré) e 30 dias após (pós) a vacinação contra o vírus *Influenza* (VVI) (Figura 1).

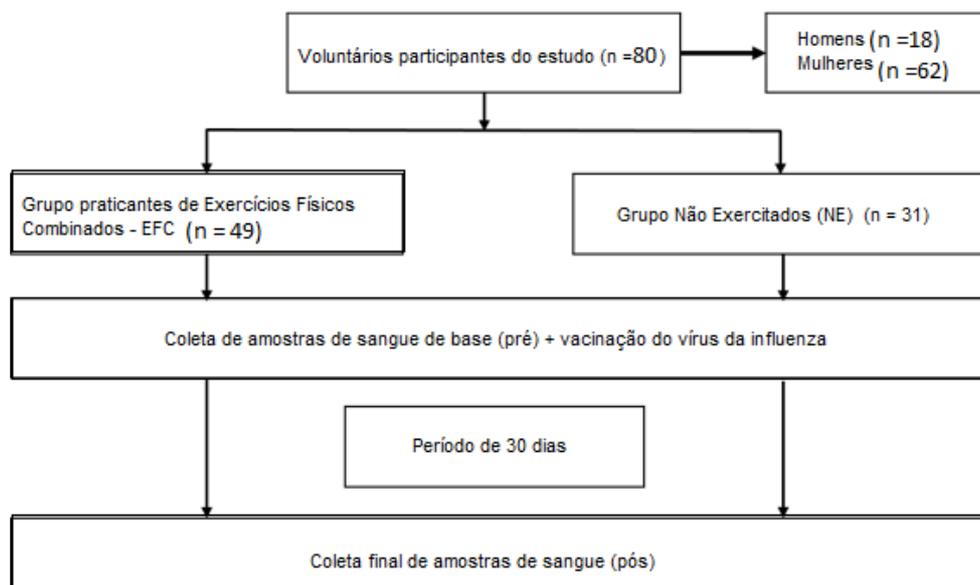


Figura 1. Fluxograma e design experimental do estudo.

Vale ressaltar que antes de qualquer procedimento, todos os riscos e benefícios do estudo foram fornecidos e discutidos com os voluntários e aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), previamente aprovado pelos: Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo (CEP-UNIFESP, número 3.623.247) e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro (CEP-UNISA, número 4.782.172), além de Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAEE número: 47125421.1.1001.0081). Vale destacar que todos os experimentos foram realizados de acordo com a Declaração de Helsinque (28).

3.2. Avaliações Antropométricas, nutricionais, clínicas e de atividade física

O exame clínico ficou sob responsabilidade do médico geriatra Carlos André Freitas dos Santos, coordenador do Ambulatório de Promoção da Saúde da Disciplina de Geriatria e Gerontologia da UNIFESP, colaborador do projeto. Foram obtidos dados antropométricos [peso, altura, índice de massa corporal (IMC)] e de composição corporal por bioimpedância (descrito a seguir).

Questionários para avaliar o hábito alimentar e estado nutricional (Recordatório de 24 horas e Frequência Alimentar) foram aplicados. Por meio deste encontramos que todos os voluntários apresentavam: dieta com no

máximo 4.000 cal/dia ou ingestão de proteínas valores acima de 1,75g/kg de massa corporal (critério de exclusão 1); não faziam uso de suplementos antioxidantes/ multivitamínicos (critério de exclusão 2) ou de anti-inflamatórios, estatinas ou outros medicamentos hipolipemiantes no momento do estudo (critério de exclusão 3).

3.3. Avaliação da composição corporal por bioimpedância

A determinação da composição corporal foi realizada por meio do equipamento de bioimpedância BIOSCAN 920-2-S (Matron International Limited, UK).

3.4. Avaliação do Nível Basal de Atividade Física

O nível de atividade física diária de cada voluntário foi determinado por meio do Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ), pois segundo Matsudo e colaboradores (29), este questionário é válido como instrumento para medir nível de atividade física.

Vale destacar que, baseados na definição do Colégio Americano de Medicina do Esporte (25), se um indivíduo, que apresenta níveis de atividades físicas abaixo de 150 minutos semanalmente, este é considerado sedentário. Assim, a identificação de níveis de atividade física acima deste valor de corte, classifica o indivíduo como ativo.

3.5. Programa de treinamento combinado

O exercício físico constituído pelo programa de treinamento combinado, consistiu em treinos de 3 (três) dias por semana, com 1 (uma) hora de treino para cada dia. Durante todo o estudo, todos os voluntários foram supervisionados por um profissional de Educação Física, para garantir a continuidade do programa de exercícios físicos combinados propostos.

A periodização, frequência e intensidade utilizadas no programa de treinamento, foram baseadas nas recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte e da Associação Americana de Cardiologia (30) que preconizam: para atividades aeróbias de intensidade moderada, acumular pelo

menos 30 até 60 minutos por dia, em sessões de no mínimo até 10 minutos cada, totalizando 150 a 300 minutos por semana que podem ser distribuídos em até 5 dias, ou ainda realizar 20 a 30 minutos por dia de atividade em intensidade vigorosa, totalizando 75 a 150 minutos por semana, que podem ser distribuídos de 2 a 3 dias. A combinação de atividade moderada e vigorosa também proporcionam equivalentes benefícios (31).

O programa de treinamento combinado foi constituído por exercícios aeróbios (variando entre 60 e 75% frequência cardíaca máxima), associados a exercícios de resistência muscular localizada (musculação), variando entre 50 à 60% de 1RM (repetição máxima).

Cada sessão de treinamento foi constituída por 30 minutos de exercícios aeróbios, de intensidade moderada, que variam de 60 a 75% de sua frequência cardíaca máxima ($F_c\text{-max}$), avaliada por meio de um frequencímetro (marca Polar, modelo FT1, Polar - Finlândia), realizados tanto com exercícios para a melhoria da estabilização postural e do ritmo (com aulas de dança), como exercícios realizados em equipamentos como *step* e cama elástica (*jump*). A manutenção da intensidade moderada ocorreu a partir das equações 220 menos a idade (220-idade), creditado a Karvonen, tendo seus valores comparados a equação $208\text{ menos }0,7\text{ vezes a idade}$ ($208 - 0,7 \times \text{idade}$) apresentada por (32).

O treinamento com exercícios resistidos localizados foi realizado em intensidade moderada, variando entre 50 e 60% de 1RM (repetição máxima), respeitando as diretrizes preconizadas pela ACSM para a prescrição de exercícios resistidos. Os exercícios envolveram 5 a 10 diferentes exercícios para os seguintes grupos musculares: membros inferiores e superiores, abdômen, glúteos e aqueles relacionados à estabilização postural, incluindo dorsal e lombar. Os exercícios foram realizados em 2 séries de 10 a 20 repetições, 30 minutos por dia, com uso de anilhas ou pesos livres, logo após o término do treino aeróbio. O treino resistido foi aplicado 2 a 3 vezes por semana e, cada sessão de treino envolveu diferentes combinações de dois grupos musculares descritos acima, sendo realizados em 4 dias consecutivos. A intensidade do treinamento resistido foi avaliada por meio da escala subjetiva de Borg.

Além disso, outro tipo de exercício aplicado para a melhoria do condicionamento físico, tanto da capacidade aeróbia, como da força muscular dos idosos praticantes de exercício físico, envolveu o treinamento em circuito

funcional, utilizado como outra variação de exercícios semanais.

O programa de exercícios físicos combinados foi realizado nas dependências do Centro Educacional e Esportivo Ibirapuera, pertencente à Secretaria Municipal de Esportes (SEME), sob supervisão da profissional de mesma profissão de Educação Física, responsável pela aplicação de programas de exercícios físicos para idosos da SEME desde 1986.

3.6. Vacinação contra o vírus da gripe

Todos os voluntários participantes deste estudo foram submetidos à VVI sazonal em 2019. A vacina trivalente era composta por dois tipos de vírus *Influenza A* [A / Michigan / 45/2015 (H1N1) e A / Suíça / 8060/2017 (H3N2)] e um tipo de vírus *Influenza B* (B / Colorado / 06/2017).

3.7. Coleta de Amostras de Sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e em tubos sem qualquer agente anticoagulante em dois momentos diferentes: antes (pré) e após 30 dias (pós) da VVI. O sangue coletado em tubos contendo EDTA foi utilizado para obtenção e avaliação dos linfócitos TCD8+, conforme descrito em detalhes logo a seguir. Já, alíquotas de soro foram obtidas após coagulação do sangue no tubo e centrifugação por 10 minutos, 300xg, a 4°C. O soro foi utilizado para avaliar a resposta de anticorpos específicos (IgA, IgM e IgG) para VVI e IgG específico para CMV, bem como os níveis de citocinas pró (IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10). É importante esclarecer que, em relação aos voluntários do grupo EFC, estes foram orientados a realizar a última sessão de treinamento físico 24h antes da coleta das amostras de sangue.

3.8. Determinação da resposta de anticorpos específicos para a vacinação contra o vírus da gripe e CMV

Os níveis séricos de IgG específico para CMV foram determinados por meio de um teste ELISA comercial (BioClin, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Em relação à avaliação dos níveis séricos de imunoglobulina

específica A (IgA), IgM e IgG para VVI, foi realizado um teste ELISA "in-house" seguindo o procedimento anteriormente apresentado pelo nosso grupo (Bachi et al. 2013). Resumidamente, as amostras de soro foram diluídas 1:4.000, para testes de IgA e IgM, ou 1: 10.000, para teste de IgG, em um tampão PBS-T-BSA (PBS contendo 0,1% de Tween (PBS-T) e 0,25% de BSA). Anticorpos secundários (anticorpos anti-humanos conjugados com peroxidase) para IgA, IgM e IgG (Sigma, St. Louis, MO) foram usados diluídos 1: 4000 em tampão PBS-T-BSA. Um leitor de microplaca (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer ThermoFisher) foi usado para ler a absorbância a 450nm.

3.9. Ensaio de inibição de hemaglutinação (IHA)

O ensaio de inibição da hemaglutinação (IHA) foi realizado conforme descrito anteriormente por nosso grupo em Monteiro et al. 2020. Resumidamente, usamos o mesmo volume (1:1, v/v) de glóbulos vermelhos de galinha (CRBCs) e vírus IA H1N1 (concentração de 4 unidades de hemaglutinação por 50µl em PBS) em placas de fundo redondo de 96 poços. Os soros foram diluídos em série de 1:2 a 1:2.048 e, em seguida, o vírus IA H1N1 diluído foi adicionado. Esta mistura foi incubada por pelo menos 30 minutos em temperatura ambiente e CRBCs (1%) foram adicionados logo em seguida. Realizou-se nova incubação por 30 minutos à temperatura ambiente com agitação e, em seguida, foi analisada a presença ou ausência de aglutinação. O título IHA da amostra de soro foi determinado como o inverso da última diluição onde as células não foram aglutinadas. Foi considerado significativo o aumento de quatro vezes no título de IHA pós-vacinação, em relação aos valores pré-vacinação (33).

3.10. Determinação dos linfócitos TCD8+ “naive” e efetoras

A imunofenotipagem dos linfócitos TCD8+, particularmente em termos de perfis “naive” e efetoras, foi realizada conforme descrito anteriormente por nosso grupo em Monteiro et al. (26). Resumidamente, 1×10^6 células foram usadas para imuno-marcação com os anticorpos monoclonais para ensaios em citometria: anti-CD3 APCCy7 (clone SK7), anti-CD8 PerCP (clone SK1), anti-CD27 APC

(clone O323), anti-CD45RA PE (clone HI100) e anti-CD197 FITC (CCR7, clone G043H7). Os números absolutos dos linfócitos TCD8+ “naive” e efetoras foram determinados como: $CD3+CD8+CD45RA+CD27+CD197+$ e $CD3+CD8+CD45RA+CD27-CD197-$ respectivamente. As estratégias de análise são mostradas na Figura 2. Após a imuno-marcação, 500.000 eventos foram adquiridos em um citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e, em seguida, analisados com o software FlowJo (versão 10.2, BD Biosciences, San Carlos, CA, EUA). Com o objetivo de obter resultados robustos e confiáveis da caracterização fenotípica de linfócitos TCD8+, conforme também apresentado anteriormente em Monteiro et al. (26), “a estratégia de análise empregada é conhecida como FMO (fluorescência menos um), que é amplamente usada para identificar mais precisamente onde selecionar os “gates” de população de células de interesse quando múltiplos fluorocromos são usados em um determinado painel.” Na Figura 2 é apresentado um gráfico de pontos representativo do painel de citometria de fluxo usado para a detecção dos linfócitos TCD8+ “naive” e efetoras, partir do isolamento das células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) que foram marcadas com anticorpos que reconhecem CD3, CD8, CD45RA, CD27 e CD197 e analisadas por citometria de fluxo, conforme indicado abaixo.

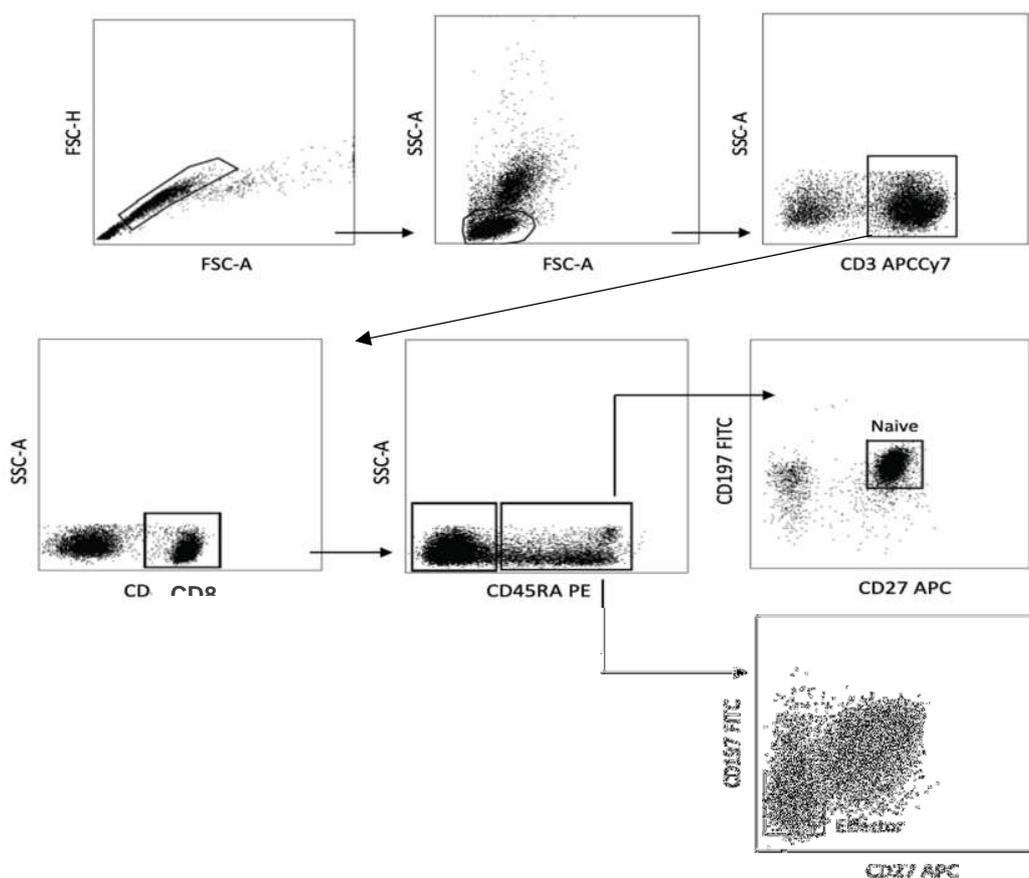


Figura 2. Análise por citometria de fluxo do perfil de células TCD8+ “naive” e efetoras. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram marcadas com anticorpos que reconhecem CD3, CD8, CD45RA, CD27 e CD197 e analisadas por citometria de fluxo.

3.11. Determinação de citocinas pró e anti-inflamatórias

As concentrações de citocinas pró (IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) sistêmicas foram determinadas nas amostras de soro por kits ELISA comerciais (Invitrogen da Thermo Fisher Scientific, Viena, Áustria) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de cada citocina foi calculada utilizando-se curvas padrão apropriadas, que foram obtidas seguindo as instruções dos fabricantes. Todos os coeficientes de correlação das curvas padrão alcançaram a faixa de 0,95 a 0,99, enquanto os coeficientes de variância intra-ensaio foram de 3-7% e os coeficientes de variância inter-ensaio foram de 7-10%.

3.12. Análise estatística

Primeiramente, os dados aqui obtidos foram analisados contra a hipótese de normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, seguido da análise de homogeneidade de variância analisada pelo teste de *Levene*.

Os dados relativos aos dados antropométricos e níveis de atividade física apresentaram distribuição normal e, por isso, são apresentados como média e desvio padrão. Com base nessas observações, o teste T de *Student* foi usado para determinar a ocorrência de diferenças significativas nesses dados entre os grupos de voluntários.

Em relação aos dados obtidos nas respostas de anticorpos, tanto para VVI quanto para o CMV, e, também, nos níveis de citocinas e linfócitos TCD8+, foi encontrado um desvio da normalidade (variáveis não paramétricas). Dessa forma, esses dados são apresentados como mediana e intervalos interquartis e utilizou-se o teste de *Kruskall-Wallis* com o pós-teste de *Müller-Dunn* para verificar se a diferença entre esses parâmetros nos grupos de idosos foi significativa.

Além disso, a análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para verificar a ocorrência de correlações significativas entre as respostas de anticorpos para VVI e para o CMV, bem como entre as respostas de anticorpos e os níveis de citocinas.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 8.1.2.

4. RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos com relação às características antropométricas e nível semanal de atividades físicas nos grupos de idosos participantes do estudo. Pode-se observar que o grupo NP apresentou não apenas maior peso e conseqüentemente elevado IMC, como também maior porcentagem de gordura corporal e menor massa livre de gordura do que o grupo EFC. Como esperado, os voluntários do grupo NP mostraram níveis de atividade física mais baixos e maior tempo na posição sentada do que os voluntários do grupo EFC.

Tabela 1. Características físicas e antropométricas dos idosos grupos não praticantes (NP) e praticantes de um programa de exercícios físicos combinados (EFC).

Características	Voluntários (n=84)		Valor p
	NP (n=31)	EFC (n=53)	
Idade (anos)	74.1 ± 6.4	71.7 ± 5.8	>0.05
Altura (m)	1.57 ± 0.08	1.56 ± 0.09	>0.05
Peso (kg)	70.3 ± 11.2*	62.3 ± 10.4	=0.004
Índice de massa corporal (kg/m ²)	28.1 ± 3.9*	25.4 ± 3.7	=0.002
Gordura corporal total (%)	39.3 ± 9.6*	35.4 ± 7.5	=0.04
Massa livre de gordura (%)	60.3 ± 9.3*	64.7 ± 7.6	=0.02
Massa muscular esquelética (kg)	19.7 ± 4.5	20.1 ± 3.7	>0.05
IPAQ			
Atividade física (min/week)	438 ± 230*	708 ± 158	<0.0001
Sentado (min/week)	1720 ± 565*	1379 ± 497	=0.02

* diferença significativa em relação aos valores encontrados no grupo EFC.

Conforme mostrado na Figura 3, os níveis séricos de IgG específica para infecção pelo CMV (Figura 3A) e para a VVI (Figura 3B) permaneceram inalterados entre os valores pré e pós-vacinação em ambos os grupos de voluntários. Em relação aos níveis séricos de IgA específica para VVI (Figura 3C), o grupo EFC apresentou maior concentração pós-vacinação do que os valores pré-vacinação ($p < 0,01$). Em relação aos níveis séricos de IgM específica para VVI (Figura 3D), ambos os grupos de voluntários apresentaram concentração pós-vacinação superior aos valores pré-vacinação (NP = $p < 0,05$ e EFC = $p < 0,001$).

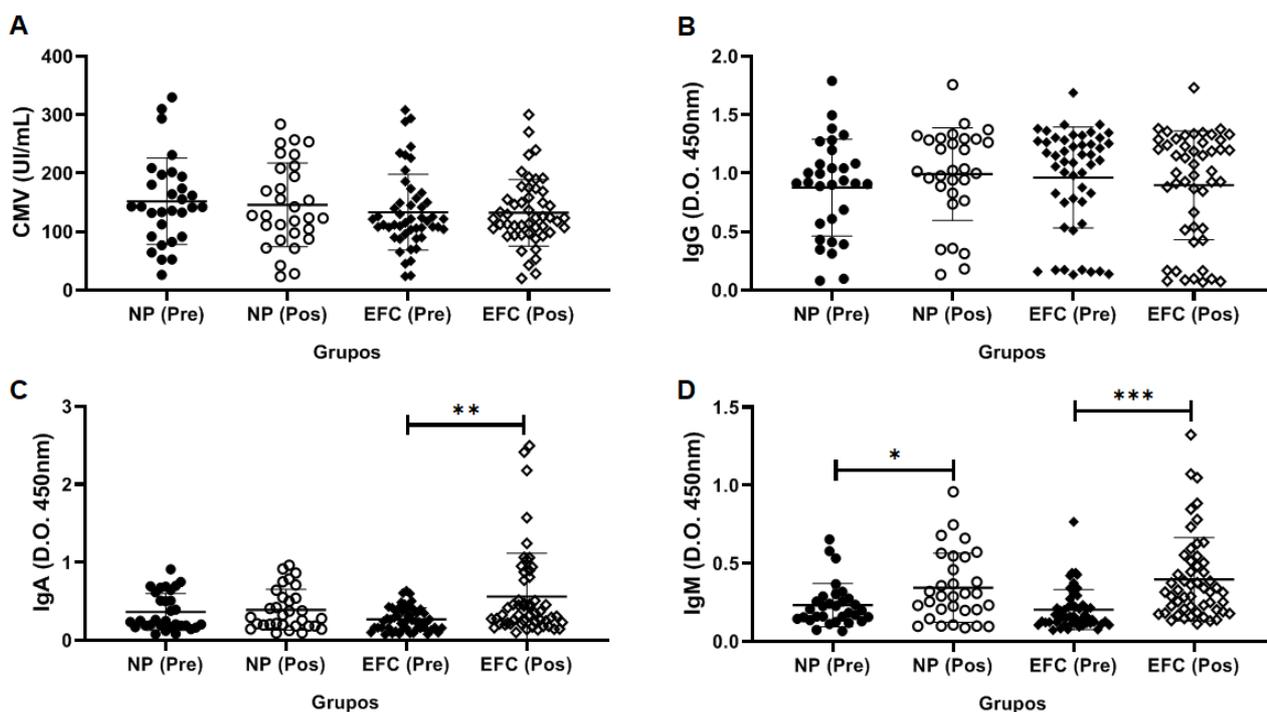


Figura 3. Concentração sérica (média \pm DP) de IgG específico para citomegalovírus (CMV, A, UI/mL), e também dos anticorpos IgG (B), IgA (C) e IgM (D) específicos para o vírus *Influenza* (D.O. 450nm) nos grupos de voluntários idosos (não praticantes, NP e praticantes de exercícios físicos combinados, EFC), tanto antes (pré) quanto após 30 dias (pós) da vacinação. Nível de significância de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na Figura 4 são apresentados os resultados obtidos na avaliação das citocinas séricas. Em relação aos níveis séricos de IL-6 (Figura 4A) e IL-10 (Figura 4B), não foram encontradas diferenças entre os valores pré e pós-vacinação em ambos os grupos de voluntários. No entanto, na análise da razão

entre IL-10 e IL-6 (IL-10/IL-6, Figura 4C), uma razão maior foi encontrada no grupo EFC pós-vacinação do que os valores pré-vacinação ($p < 0,05$).

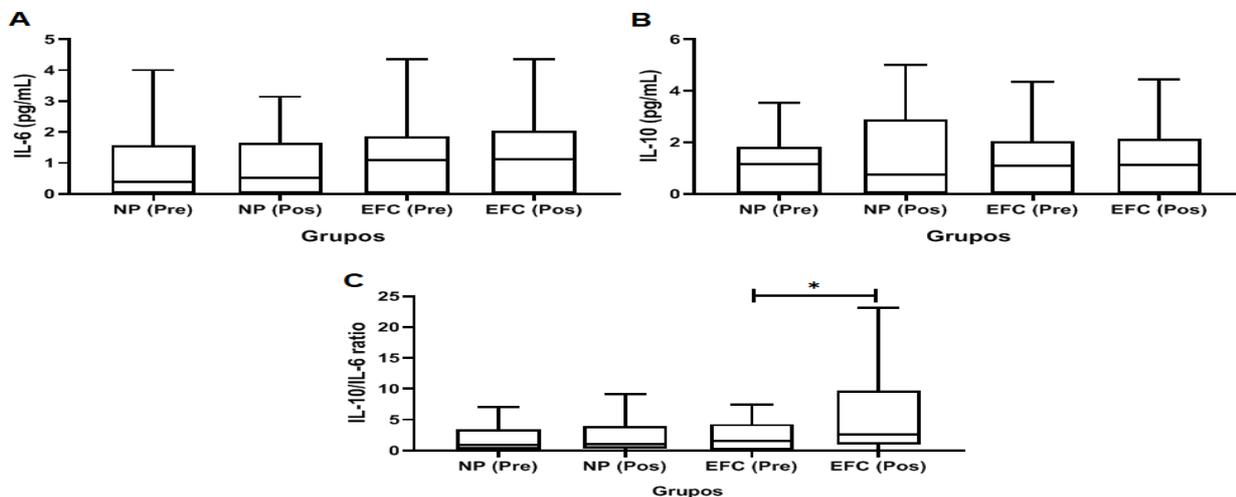


Figura 4. Concentração sérica (mediana e intervalo interquartil) de interleucina (IL) -6, IL-10 e a razão entre IL-10 e IL-6 (IL-10/IL-6) nos grupos de voluntários idosos (não praticantes - NP; praticantes de exercícios físicos combinados - EFC), tanto antes (pré) quanto após 30 dias (pós) da vacinação. Nível de significância de * $p < 0,05$.

A Figura 5 mostra a análise de correlação entre os níveis de anticorpos séricos para CMV e IgA (Figura 5A), IgM (Figura 5B) e IgG (Figura 5C), antes e após a VVI, nos grupos de voluntários (NP e EFC). Como pode ser observado, não foram encontradas correlações entre os resultados de CMV e IgA (Figura 5A) ou IgM (Figura 5B). Porém, em relação à correlação entre os níveis de CMV e IgG (Figura 5C), enquanto o grupo NP não apresentou correlação, o grupo EFC apresentou correlação negativa significativa tanto pré quanto pós vacinação.

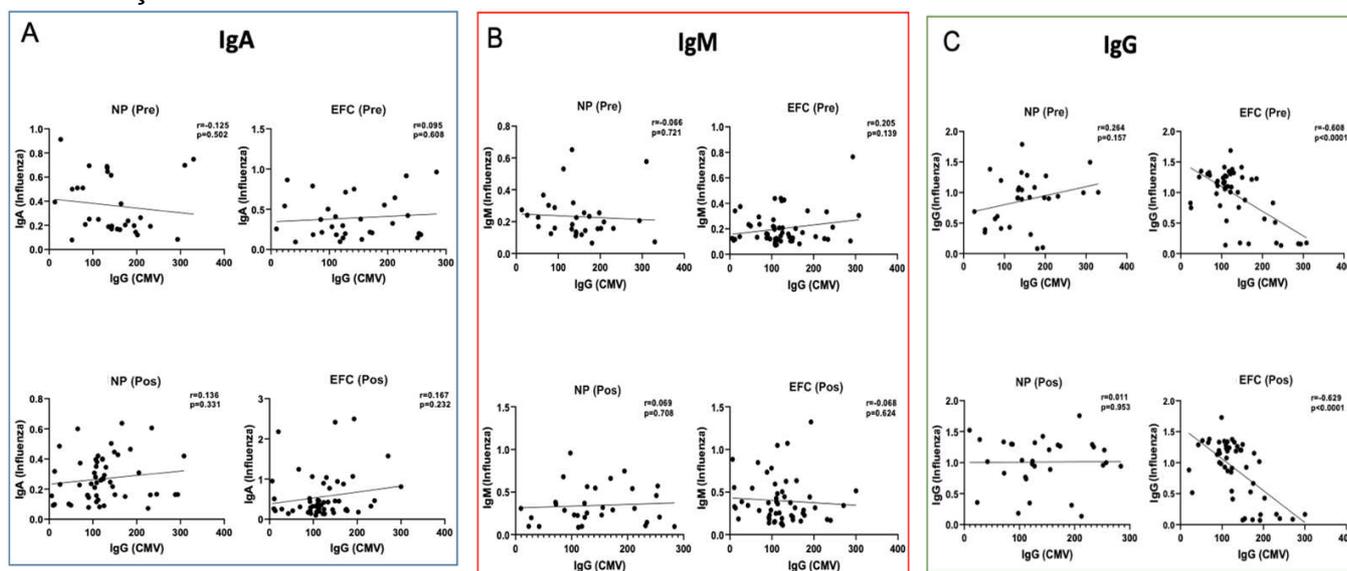


Figura 5. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis de anticorpos séricos para CMV e IgA específico (A), IgM (B) e IgG (C) para VVI nos grupos de voluntários (NP e EFC), nos períodos pré e pós-vacinação. Nível de significância de $*p < 0,05$.

Na Figura 6 é mostrada a análise de correlação entre os níveis séricos de IL-6 e IgG específico para VVI ou CMV nos grupos de voluntários (NP e EFC), pré e pós-vacinação. Em relação aos resultados obtidos nesta análise, não foram encontradas correlações significativas entre os níveis séricos de IL-6 e a resposta de anticorpos específicos para a VVI ou CMV.

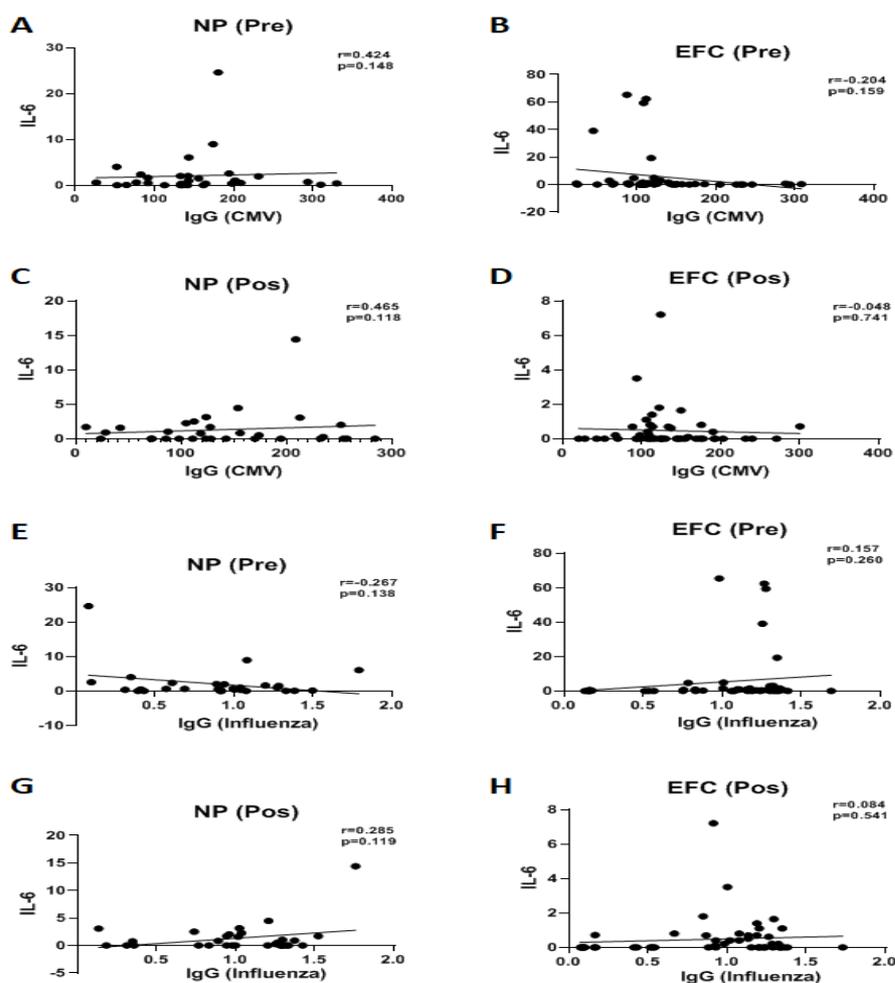


Figura 6. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis séricos de IL-6 e IgG específico para CMV nos grupos de voluntários, pré- (NP - A e EFC - B) e pós-vacinação (NP - C e EFC - D), e entre IL-6 e IgG específico para VVI nos grupos de voluntários, pré- (NP - E e EFC - F) e pós-vacinação (NP - G e EFC - H). Nível de significância de $*p < 0,05$.

Figura 6. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis séricos de IL-6 e IgG específico para CMV nos grupos de voluntários, pré- (NP - A e EFC - B) e pós-vacinação (NP - C e EFC - D), e entre IL-6 e IgG específico para VVI nos grupos de voluntários, pré- (NP - E e EFC - F) e pós-vacinação (NP - G e EFC - H). Nível de significância de $*p < 0,05$.

Na Figura 7 é apresentada a análise de correlação entre os níveis séricos de IL-10 e IgG específico para VVI ou CMV nos grupos de voluntários (NP e EFC), pré e pós-vacinação. Em relação aos resultados obtidos na análise de correlação entre IL-10 e resposta de anticorpos específicos para CMV, foram encontradas correlações negativas significativas nos grupos de todos os voluntários, tanto pré quanto pós-vacinação (painel superior - A, B, C e D). Curiosamente, na análise de correlação entre IL-10 e a resposta de anticorpos específicos para a VVI, correlações positivas significativas foram observadas apenas no grupo EFC pré e pós-vacinação (painel inferior - E, F, G e H).

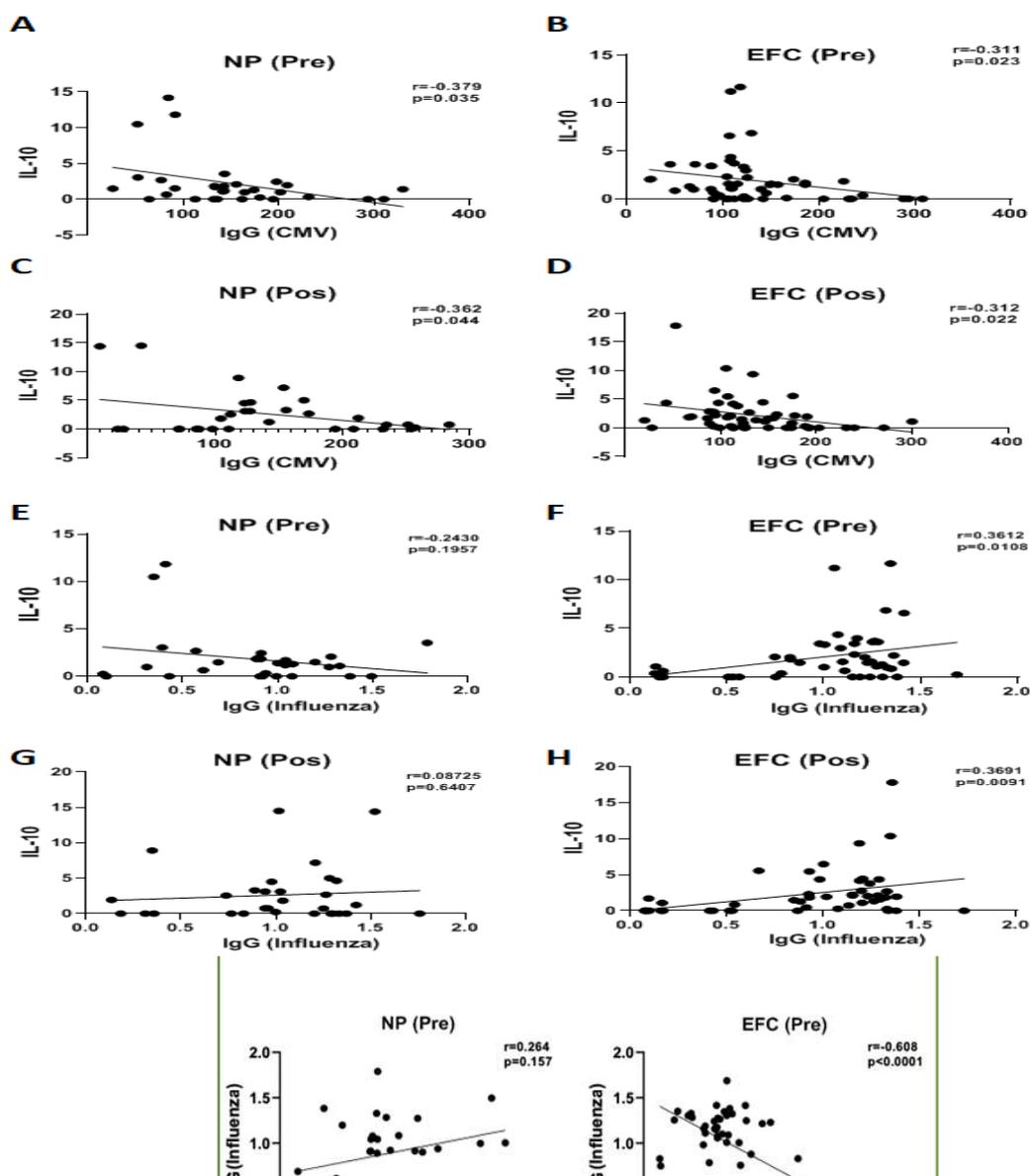


Figura 7. A análise do coeficiente de correlação de *Spearman* foi usada para identificar a correlação entre os níveis séricos de IL-10 e IgG específico para CMV nos grupos de voluntários, pré- (NP - A e EFC - B) e pós-vacinação (NP - C e EFC - D), e entre IL-10 e IgG específico para vacinação contra o vírus *Influenza* nos grupos de voluntários, pré- (NP - E e EFC - F) e pós-vacinação (NP - G e EFC - H). Nível de significância de * $p < 0,05$.

Com base na observação de que alguns participantes de ambos os grupos responderam ou não ao VVI, realizamos uma análise separando esses voluntários em subgrupos: “respondentes” e “não respondentes”.

Como mostrado na Figura 8A, os idosos que responderam ao VVI de ambos os grupos apresentaram níveis mais baixos de IgG específica para CMV pós-vacinação do que pré-vacinação (NP: $p < 0,05$; EFC: $p < 0,001$). A Figura 8B mostra que os níveis de IL-6 permaneceram inalterados entre os subgrupos de respondentes e não respondentes, tanto antes como após a vacinação. No entanto, na Figura 8C, é mostrado que o subgrupo respondedor do grupo EFC apresentou um aumento significativo dos níveis de IL-10 pós-vacinação em comparação com aqueles pré-vacinação ($p < 0,05$). Além disso, as Figuras 8D, mostram que, enquanto os subgrupos respondedores dos grupos NP e EFC apresentaram números absolutos mais altos de células TCD8+ efetoras e ingênuas pós-vacinação do que pré-vacinação ($p < 0,01$), apenas o subgrupo respondedor do grupo EFC apresentou números absolutos aumentados de células TCD8+ ingênuas quando comparadas ao subgrupo não respondedor do

grupo EFC pós-vacinação ($p < 0,05$). Finalmente, como mostrado na Figura 8F, uma redução significativa na proporção de células TCD8+ efetoras para “naive” foi apresentada pelo subgrupo respondedor em comparação com o subgrupo não respondedor do mesmo grupo EFC pós-vacinação ($p < 0,05$).

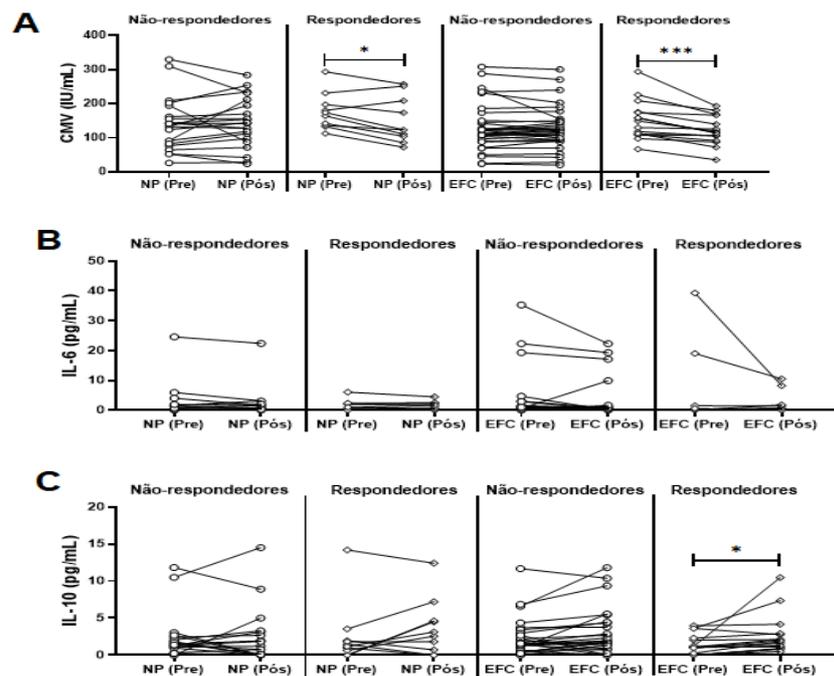


Figura 8. Comparação entre os respondentes e não respondentes dos não praticantes (NP) e praticantes de grupos de exercício físico combinado (EFC) para a vacinação contra o vírus da influenza (VVI) para IgG específica para citomegalovírus (CMV) (A) e níveis de IL-6 (B) e IL-10 (C), bem como “naive” (D), efetora (E) e a razão de células TCD8+ efetora/“naive” pré e pós-vacinação. Em (D – F), os resultados dos que não responderam são apresentados em vermelho, enquanto os do respondente são apresentados em azul. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5. Discussão

Neste estudo, pudemos demonstrar que, de acordo com a literatura, os idosos praticantes do programa EFC apresentaram melhor resposta de anticorpos específicos (IgA e IgM) ao VVI e razões IL-10/IL-6 mais altas. Curiosamente, tanto a IgG específica para a vacina quanto o CMV, bem como os níveis de IL-6 e IL-10, permaneceram inalterados nos momentos avaliados aqui. No entanto, a partir do ensaio HAI, verificou-se que percentagens semelhantes de voluntários em ambos os grupos responderam ao VVI. Embora as reduções nos níveis de IgG específica para CMV e aumentos nas células

TCD8+ “naive” e efetoras tenham sido encontradas em ambos os subgrupos de resposta pós-vacinação, apenas os respondentes do grupo EFC mostraram reduções na proporção de célula TCD8+ efetor para “naive” e aumento nos níveis de IL-10 pós-vacinação. Além disso, correlações significativas foram observadas. A este respeito, foram encontradas correlações negativas entre os níveis específicos de IgG para a vacina e CMV no grupo EFC e entre IL-10 e os níveis específicos de IgG para CMV em todos os grupos de voluntários pré e pós-vacinação. Além disso, uma correlação positiva entre IL-10 e IgG específica para VVI foi observada pré e pós-vacinação. Por fim, os níveis de IL-6 não apresentaram correlação com os demais parâmetros avaliados.

Desde que o termo “inflammaging” foi cunhado, diversos estudos foram desenvolvidos para aprimorar o conhecimento sobre o impacto do estado inflamatório no processo de envelhecimento. Em relação aos dados atuais, o fenômeno “inflammaging” é caracterizado por maiores níveis sistêmicos e crônicos de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-6, ambas citocinas pró-inflamatórias, em associação com menores níveis de IL-10, uma clássica citocina anti-inflamatória. Alguns relatos apontam que esse desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias em idosos pode ser considerado uma das principais causas do aumento do risco de desenvolver várias doenças, como sarcopenia, aterosclerose e Alzheimer, além de interferir no sistema imunológico resposta e respostas de vacinação (15, 34). Embora os mecanismos que desencadeiam o fenômeno “inflammaging” não sejam totalmente compreendidos, é amplamente aceito que a obesidade e a infecção pelo CMV são dois fatores envolvidos não apenas no desencadeamento, mas também na manutenção desse prejudicial fenômeno relacionado à idade.

Uma prova relevante de que a infecção por CMV é uma peça notável no quebra-cabeça da inflamação é que o CMV é capaz de promover a ativação e translocação de NF- κ B do citoplasma para o núcleo, induzindo um aumento da produção de TNF- α e IL-6, levando a uma regulação positiva da resposta pró-inflamatória (18, 35, 36). Com base na literatura, o CMV tem a capacidade de manter um estado de latência de longa duração dentro do organismo hospedeiro. Ressalta-se que a prevalência da infecção pelo CMV é maior e suas taxas de infecção aumentam com a idade, podendo chegar a 95% em idosos (36, 37).

Apesar do CMV ser capaz de induzir a produção de IL-6, conforme citado

acima, neste estudo não observamos correlação entre os níveis séricos de IgG específica para CMV e IL-6 em todos os grupos de voluntários nos tempos avaliados. Ao contrário, a análise de correlação entre os níveis séricos de IgG específica para CMV e IL-10 mostrou correlações negativas nos dois grupos, tanto pré quanto pós-vacinação. Particularmente, este último achado pode reforçar nossa descrição anterior de que a infecção por CMV ocorre e é mantida em um ambiente mais pró-inflamatório e anti-inflamatório reduzido (22), uma vez que os níveis mais elevados de anticorpos para CMV foram encontrados nos participantes com menor IL-10 circulante.

Outro ponto que merece destaque é que não há consenso sobre o impacto da infecção pelo CMV no VVI. De fato, alguns estudos demonstraram que a soropositividade para CMV está negativamente associada à resposta de anticorpos específicos ao VVI, enquanto outros estudos não mostraram associação entre soropositividade para CMV e VVI, principalmente em idosos (38, 39). É de extrema importância relatar que idosos com maior soropositividade para CMV apresentaram respostas reduzidas de células TCD4⁺ e, mais proeminentemente, de células TCD8⁺ para antígenos do vírus *Influenza*, o que demonstra que a infecção pelo CMV poderia influenciar a resposta imune contra este vírus (18). Além disso, também vale citar que, ao contrário do observado em idosos, os adultos jovens com infecção por CMV apresentaram aumento da resposta imune a VVI (15). Em nosso estudo, evidenciamos que os níveis séricos de IgG específica para CMV e a VVI permaneceram inalterados tanto pré quanto na pós-vacinação em todos os grupos de voluntários. Embora nosso grupo de pesquisa tenha previamente demonstrado que idosos que se exercitam apresentaram melhora nos níveis de IgG específica para VVI (12), mais recentemente, também descobrimos que um grupo de idosos que praticam exercícios físicos não apresentou alterações nos níveis de IgG específica para VVI (26). Como mencionado neste estudo anterior (26), a VVI sazonal, infelizmente, pode influenciar negativamente a resposta imune (40) e nenhuma melhora nos níveis de IgG específica para a vacina pôde ser encontrada (26).

Entre vários aspectos que poderiam explicar a falta de resposta imune observada após VVI, foi relatado que a dose de vacina usada tem uma influência singular na indução de uma resposta imune robusta na população idosa. A esse respeito, há estudos, tanto originais quanto metanálises sistemáticas, na

literatura científica destacando que, entre os idosos, a vacina de alta dose para *Influenza* (60 µg de hemaglutinina por cepa de vírus) é mais imunogênica, bem tolerada e pode fornecer melhor proteção contra infecções de influenza do que a vacina de dose padrão (15 µg de hemaglutinina por cepa de vírus) (41). Com base nesses dados, podemos sugerir que os níveis inalterados de IgG específica 30 dias após a VVI poderiam ser atribuídos, pelo menos em parte, à vacina de dose padrão que foi administrada nos participantes do presente estudo.

Embora nosso grupo tenha demonstrado as respostas de anticorpos ao VVI, comparando os dados obtidos pré e pós-vacinação, em uma população idosa por meio dos valores de densidade óptica (DO) do ELISA, também avaliamos os títulos de anticorpos com o ensaio HAI em a fim de compreender melhor a resposta imune desencadeada pela VVI. De acordo com a literatura, a análise dos títulos de anticorpos é uma ferramenta bem aceita para a avaliação da proteção contra o VVI (33, 42). Assim, por meio do ensaio HAI, verificamos que percentuais semelhantes de idosos em ambos os grupos de voluntários responderam a VVI. Curiosamente, esses respondedores mostraram uma redução significativa dos níveis de IgG específica para o CMV pós-vacinação. Vale esclarecer que todos os voluntários inscritos neste estudo eram soropositivos para CMV, e essas observações podem acrescentar mais peças a esse quebra-cabeça. Além disso, quando avaliamos os resultados da análise de correlação, enquanto o grupo NP não apresentou correlação, o grupo EFC apresentou correlação negativa significativa entre os valores de IgG específica para CMV e VVI.

É sabido que a prática regular de exercícios físicos é uma intervenção não farmacológica que beneficia o sistema imunológico desde a produção, diferenciação, maturação e ativação dos leucócitos até suas ações, a fim de garantir proteção contra diversos desafios imunológicos, como vacinação em adultos mais velhos (43, 44). Na verdade, esta capacidade proeminente de treinamento físico para aumentar a eficácia da vacina é mais pronunciada em situações onde a vacinação mostra baixa imunogenicidade, como na imunossenescência (43). Nesse sentido, nosso grupo demonstrou que o EFC pode melhorar significativamente não apenas as respostas imunes sistêmicas, tanto celulares quanto humorais, mas também as respostas imunes nas vias aéreas da mucosa contra VVI em idosos (26, 27). Corroborando essas

informações, apresentamos neste estudo que o grupo de voluntários que praticava o programa EFC apresentou aumento dos níveis séricos de IgA específica e IgM pós-vacinação em comparação aos valores basais. Vale ressaltar que o aumento dos níveis séricos de IgM específica pós-vacinação em comparação aos basais no grupo NP pode ser atribuído ao fato de os voluntários desse grupo serem classificados como idosos ativos. Esta última observação também pode reforçar os dados de que um estilo de vida ativo tem a capacidade de atenuar a imunossenescência e, conseqüentemente, preservar a resposta imunológica durante o envelhecimento.

Embora fosse esperada uma melhora nos níveis séricos de IgG específica para VVI, principalmente no grupo EFC, a observação de diferenças na análise de correlação entre os dois grupos de voluntários pode ser corroborada por alguns dados da literatura (45). A esse respeito, foi postulado que existe uma associação inversa entre a eficácia da vacina e o status sorológico para CMV, conforme observado neste estudo exclusivamente no grupo EFC. Além disso, é fundamental ressaltar que há relatos de que o controle da infecção pelo CMV associado a uma redução significativa da carga viral imposta ao sistema imunológico por meio da prática regular de exercícios físicos seria capaz de melhorar a eficácia da vacina. Também é importante ressaltar que, de acordo com a literatura, o notável efeito do treinamento físico nesse contexto não pode ser observado em indivíduos que apresentassem bom controle da infecção por CMV (45).

Apesar do real efeito do treinamento físico neste contexto não estar totalmente determinado, alguns estudos postulam que os benefícios desta intervenção podem ser atribuídos à sua capacidade de melhorar o "turnover" de células T, no qual estas células com fenótipo de senescência são induzidas a morrer por apoptose e o "espaço" que sobra seria preenchido por novas células T funcionais (26, 45, 46). Em consequência, a renovação de um "pool" de células T de um aspecto de senescência para um perfil funcional pode conter ou diminuir a infecção por CMV, o que também pode reduzir o estímulo antigênico e o número de células T específicas de CMV "mais antigas", levando ao controle da reativação do CMV (47, 48), uma vez que cerca de 25% das células TCD8+ podem mostrar especificidade para um único epítipo imunodominante para CMV em idosos soropositivos para este vírus (34).

Como é bem conhecido, o controle imunológico da infecção por CMV requer vigilância imunológica permanente, particularmente com um aumento de até 10% a 30% das células TCD8+ específicas para CMV na periferia, que continua a aumentar com o tempo. Como já mencionado, a infecção latente por CMV frequentemente mostra uma diminuição notável de células T “naive”, particularmente em células TCD8+ do que em células TCD4+, quando comparada àquela sem infecção por CMV. Em contraste com essas reduções nas células TCD8+ “naive”, os indivíduos soropositivos para CMV apresentam uma elevação nas porcentagens de células TCD8+ de memória e efetora, que podem levar a um comprometimento da resposta imune (49, 50). Nesse sentido, foi relatado que as células TCD8+ específicas para CMV apresentam fenótipo diferenciado avançado, que frequentemente é caracterizado pelas expressões de CD45RA e CD57 em associação com a ausência de CD27, CD28 e CCR7. Em contraste, as células TCD8+ “naive” apresentam expressões de CD45RA, CD27, CD28 e CCR7 (33, 51, 52). Com base nesses dados, a modulação de células TCD8+ “naive” e efetoras é útil para alcançar uma resposta imune contínua e ativa não apenas à infecção por CMV, mas também a outros desafios imunológicos, como vírus respiratórios e/ou vacinas (33, 51). Corroborando essa sugestão, observamos que o subgrupo de idosos que respondem a VVI mostrou uma elevação tanto de células TCD8+ “naive” quanto efetoras. Em particular, os idosos que praticavam exercícios físicos combinados também mostraram diminuições significativas na proporção de células TCD8+ efetoras para “naive”. Esse achado notável está de acordo com a literatura, que mostrou que o treinamento físico combinado impulsiona o aumento do número de células TCD8+ CD28+ na periferia (53, 54) em idosos, e nos permite sugerir que a prática regular de EFC é capaz de melhorar o número de células TCD8+ “naive” em relação as células TCD8+ efetoras, permitindo, assim, que a resposta imune mantenha sua capacidade de responder a novos desafios imunológicos.

Por mais atraente que seja esta proposta, vale ressaltar que outro efeito amplamente aceito e positivo associado à prática regular de exercícios físicos é sua propriedade de gerar um estado anti-inflamatório sistêmico (55). Foi relatado que o treinamento físico pode regular positivamente a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, em associação com a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α (56, 57). Conforme relatado por Jankord et

al. (56), a regulação do estado inflamatório sistêmico, principalmente pela ação da IL-10, está relacionada a um ambiente protetor que pode ser capaz de minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento.

Conforme descrito anteriormente, o fenômeno de “inflammaging” é caracterizado por um desequilíbrio de citocinas pró e anti-inflamatórias. Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que os níveis circulantes de IL-10 diminuem com o envelhecimento (58), o que pode permitir o aumento de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-6. Portanto, a capacidade do treinamento físico em aumentar os níveis de IL-10 é útil no controle do processo de inflamação, uma vez que essa citocina apresenta um efeito supressor na secreção de muitas citocinas pró-inflamatórias. Embora nossos resultados não tenham mostrado diferenças nos níveis séricos de IL-6 e IL-10 entre os dois grupos de voluntários, o que pode ser atribuído não apenas ao fato de todos os voluntários terem um estilo de vida ativo, mas também à observação de que o treinamento físico moderado promove flutuações de curta duração em alguns níveis de citocinas (59), a relação IL-10/IL-6 apresentou aumento significativo no grupo EFC pós-vacinação. Atualmente, a análise da proporção de citocinas pró e anti-inflamatórias é útil para fornecer uma melhor visão do contexto real do estado inflamatório (60, 61). Assim, nossa observação de aumento da razão IL-10/IL-6 do grupo EFC nos permite sugerir que uma melhora do estado inflamatório sistêmico foi alcançada neste grupo, o que poderia influenciar positivamente nas melhores respostas de anticorpos específicos (IgA e IgM) para VVI, conforme observado aqui.

Corroborando sua propriedade anti-inflamatória proeminente, os níveis séricos de IL-10 mostraram uma correlação negativa significativa com IgG específica para CMV em todos os grupos de voluntários pré e pós-vacinação. Com base nesse resultado, podemos sugerir que idosos que mantêm a regulação do estado inflamatório, principalmente por meio da atividade da IL-10, são capazes de controlar melhor a infecção por CMV. Além disso, observamos que, no grupo EFC, os níveis de IL-10 se correlacionaram positivamente com os níveis de IgG específica para os antígenos presentes na vacina contra o vírus influenza. Além disso, os resultados observados da separação do grupo EFC em subgrupos de respondentes ou não respondentes a VVI, nos permitem reforçar esta sugestão, uma vez que um aumento nos níveis de IL-10 foi evidenciado

após a vacinação apenas no subgrupo respondedor, e essa regulação anti-inflamatória poderia impactar na melhora da resposta imune à vacina. Na verdade, essa observação é muito importante, uma vez que foi relatado que alterações nos níveis de IL-10 podem prejudicar a resposta imune a VVI em idosos (62, 63).

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados obtidos neste estudo mostraram, pela primeira vez, que idosos soropositivos para CMV, especialmente aqueles que fisicamente exercitados, apresentam um melhor resposta à VVI em associação com um estado anti-inflamatório e aumento de células TCD8+ "naive".

7. REFERÊNCIAS

1. ACSM. Exercise and Physical Activity for Older Adults. *The Physician and Sportsmedicine*. 1999;27(11):115-42.
2. SBGG, editor Suportes sociais na velhice: uma investigação preliminar. *Anais do XIV Congresso Brasileiro de Geriatria e Gerontologia e III Encontro Nacional das Ligas de Geriatria e Gerontologia*; 2004: GERON Salvador.
3. WHO. Active ageing: A policy framework. Geneva: World Health Organization; 2002.
4. IBGE. Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira, 2008: ibge; 2008.
5. IBGE. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística. Censo demográfico. 2010;2010.
6. Saúde OOMd. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde 2005 [Available from: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/envelhecimento_ativo.pdf].
7. Nations UU. Estimativas populacional 2019 [Available from: <https://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WorldPopulationAgeing2019-Highlights.pdf>].
8. NERI AL. Desenvolvimento E Envelhecimento2001.
9. Furtado GE, Letieri RV, Caldo A, Sardão V, Teixeira AM, de Barros MP, et al. Sustaining efficient immune functions with regular physical exercise in the COVID-19 era and beyond. *Eur J Clin Invest*. 2021:e13485.
10. McLean HQ, Thompson MG, Sundaram ME, Kieke BA, Gaglani M, Murthy K, et al. Influenza vaccine effectiveness in the United States during 2012-2013: variable protection by age and virus type. *J Infect Dis*. 2015;211(10):1529-40.
11. Prelog M. Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity? *Autoimmun Rev*. 2006;5(2):136-9.
12. Bachi AL, Suguri VM, Ramos LR, Mariano M, Vaisberg M, Lopes JD. Increased production of autoantibodies and specific antibodies in response to influenza virus vaccination in physically active older individuals. *Results Immunol*. 2013;3:10-6.
13. C F, M B, S V, F O, M DL, E O, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;908.

14. Mocarski E, Shenk T, Griffiths P, Pass R. Cytomegaloviruses, p 1960–2014. *Fields virology*, 6th ed Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2013.
15. Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, et al. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med*. 2015;7(281):281ra43.
16. Schmaltz HN, Fried LP, Xue QL, Walston J, Leng SX, Semba RD. Chronic cytomegalovirus infection and inflammation are associated with prevalent frailty in community-dwelling older women. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53(5):747-54.
17. Söderberg-Nauclér C, Nelson JY. Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system. *Intervirology*. 1999;42(5-6):314-21.
18. Frasca D, Blomberg BB. Aging, cytomegalovirus (CMV) and influenza vaccine responses. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(3):682-90.
19. Fletcher JM, Vukmanovic-Stejic M, Dunne PJ, Birch KE, Cook JE, Jackson SE, et al. Cytomegalovirus-specific CD4+ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion. *J Immunol*. 2005;175(12):8218-25.
20. de Pablo-Bernal RS, Cañizares J, Rosado I, Galvá MI, Alvarez-Ríos AI, Carrillo-Vico A, et al. Monocyte Phenotype and Polyfunctionality Are Associated With Elevated Soluble Inflammatory Markers, Cytomegalovirus Infection, and Functional and Cognitive Decline in Elderly Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2016;71(5):610-8.
21. Trzonkowski P, Myśliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, et al. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence. *Vaccine*. 2003;21(25-26):3826-36.
22. Oh SJ, Lee JK, Shin OS. Aging and the Immune System: the Impact of Immunosenescence on Viral Infection, Immunity and Vaccine Immunogenicity. *Immune Netw*. 2019;19(6):e37.
23. Grubeck-Loebenstien B, Della Bella S, Iorio AM, Michel JP, Pawelec G, Solana R. Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Aging Clin Exp Res*. 2009;21(3):201-9.
24. ACSM ACoSM. Diretrizes do ACSM para prescrição os testes de esforço e sua prescrição. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
25. American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30(6):992-1008.

26. Monteiro FR, Roseira T, Amaral JB, Paixão V, Almeida EB, Foster R, et al. Combined Exercise Training and L-Glutamine Supplementation Enhances Both Humoral and Cellular Immune Responses after Influenza Virus Vaccination in Elderly Subjects. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(4).
27. Paixão V, Almeida EB, Amaral JB, Roseira T, Monteiro FR, Foster R, et al. Elderly Subjects Supplemented with L-Glutamine Shows an Improvement of Mucosal Immunity in the Upper Airways in Response to Influenza Virus Vaccination. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(2).
28. Association GAotWM. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent*. 2014;81(3):14-8.
29. Matsudo SM, Leite T, Neto dB, Matsudo VK. Perfil antropométrico de mulheres maiores de 50 anos, fisicamente ativas, de acordo com a idade cronológica - evolução de 1 ano. *Rev Brasileira Ciência e Movimento*. 2002;10(2):15-26.
30. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc*. 2007;39(8):1435-45.
31. . !!! INVALID CITATION !!! (GARBER; BLISSMER; DESCHENES; FRANKLIN et al., 2011).
32. Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(1):153-6.
33. van den Berg SPH, Pardieck IN, Lanfermeijer J, Sauce D, Klenerman P, van Baarle D, et al. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Med Microbiol Immunol*. 2019;208(3-4):365-73.
34. Pawelec G, Derhovanessian E, Larbi A, Strindhall J, Wikby A. Cytomegalovirus and human immunosenescence. *Rev Med Virol*. 2009;19(1):47-56.
35. Prösch S, Staak K, Stein J, Liebenthal C, Stamminger T, Volk HD, et al. Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNFalpha is mediated via induction of NF-kappaB. *Virology*. 1995;208(1):197-206.
36. Kilgour AH, Firth C, Harrison R, Moss P, Bastin ME, Wardlaw JM, et al. Seropositivity for CMV and IL-6 levels are associated with grip strength and muscle size in the elderly. *Immun Ageing*. 2013;10(1):33.
37. Parry HM, Zuo J, Frumento G, Mirajkar N, Inman C, Edwards E, et al. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing*. 2016;13:1.

38. Derhovanessian E, Theeten H, Hähnel K, Van Damme P, Cools N, Pawelec G. Cytomegalovirus-associated accumulation of late-differentiated CD4 T-cells correlates with poor humoral response to influenza vaccination. *Vaccine*. 2013;31(4):685-90.
39. den Elzen WP, Vossen AC, Cools HJ, Westendorp RG, Kroes AC, Gussekloo J. Cytomegalovirus infection and responsiveness to influenza vaccination in elderly residents of long-term care facilities. *Vaccine*. 2011;29(29-30):4869-74.
40. Carlock MA, Ingram JG, Clutter EF, Cecil NC, Ramgopal M, Zimmerman RK, et al. Impact of age and pre-existing immunity on the induction of human antibody responses against influenza B viruses. *Hum Vaccin Immunother*. 2019;15(9):2030-43.
41. Lee JKH, Lam GKL, Shin T, Samson SI, Greenberg DP, Chit A. Efficacy and effectiveness of high-dose influenza vaccine in older adults by circulating strain and antigenic match: An updated systematic review and meta-analysis. *Vaccine*. 2021;39 Suppl 1:A24-A35.
42. Kim DK, Poudel B. Tools to detect influenza virus. *Yonsei Med J*. 2013;54(3):560-6.
43. 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;39:33-41.
44. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2011;17:6-63.
45. Simpson RJ, Bigley AB, Spielmann G, LaVoy EC, Kunz H, Bollard CM. Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2016;22:8-27.
46. Turner JE. Is immunosenescence influenced by our lifetime "dose" of exercise? *Biogerontology*. 2016;17(3):581-602.
47. Simpson RJ, Bosch JA. Special issue on exercise immunology: current perspectives on aging, health and extreme performance. *Brain Behav Immun*. 2014;39:1-7.
48. Simpson RJ. Aging, persistent viral infections, and immunosenescence: can exercise "make space"? *Exerc Sport Sci Rev*. 2011;39(1):23-33.
49. Almanzar G, Schwaiger S, Jenewein B, Keller M, Herndler-Brandstetter D, Würzner R, 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;79(6):3675-83.

50. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol.* 2002;169(4):1984-92.
51. van den Berg SPH, Warmink K, Borghans JAM, Knol MJ, van Baarle D. Effect of latent cytomegalovirus infection on the antibody response to influenza vaccination: a systematic review and meta-analysis. *Med Microbiol Immunol.* 2019;208(3-4):305-21.
52. Holtappels R, Pahl-Seibert MF, Thomas D, Reddehase MJ. Enrichment of immediate-early 1 (m123/pp89) peptide-specific CD8 T cells in a pulmonary CD62L(lo) memory-effector cell pool during latent murine cytomegalovirus infection of the lungs. *J Virol.* 2000;74(24):11495-503.
53. Shimizu K, Suzuki N, Imai T, Aizawa K, Nanba H, Hanaoka Y, et al. Monocyte and T-cell responses to exercise training in elderly subjects. *J Strength Cond Res.* 2011;25(9):2565-72.
54. Müller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun.* 2014;39:8-22.
55. Sperandio A, Paixão V, Almeida EB, Amaral JB, Roseira T, Monteiro FR, et al. L-glutamine supplementation improves the inflammatory profile of exercised obese elderly. *Rev Bras Saúde Global.* 2021;1(2):9.
56. Jankord R, Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(6):960-4.
57. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA.* 1999;281(18):1722-7.
58. Alvarez-Rodríguez L, López-Hoyos M, Muñoz-Cacho P, Martínez-Taboada VM. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol.* 2012;273(2):124-32.
59. 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.
60. Sun J, Su J, Xie Y, Yin MT, Huang Y, Xu L, et al. Plasma IL-6/IL-10 Ratio and IL-8, LDH, and HBDH Level Predict the Severity and the Risk of Death in AIDS Patients with Pneumocystis Pneumonia. *J Immunol Res.* 2016;2016:1583951.
61. Rong YD, Bian AL, Hu HY, Ma Y, Zhou XZ. Study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory cytokine IL-6, anti-inflammatory cytokine IL-10. *BMC Geriatr.* 2018;18(1):308.

62. Mohanty S, Joshi SR, Ueda I, Wilson J, Blevins TP, Siconolfi B, et al. Prolonged proinflammatory cytokine production in monocytes modulated by interleukin 10 after influenza vaccination in older adults. *J Infect Dis.* 2015;211(7):1174-84.
63. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection. *Front Immunol.* 2017;8:784.

ANEXOS

A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Comitê de Ética em Pesquisa – Unisa.

Rua Prof. Enéas de Siqueira Neto, 340 cep: 04829-

300 São Paulo - SP Fone: (11) 2141-8687

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o(a) Sr(a) para participar do projeto de pesquisa intitulado: AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE SARCOPENIA NUMA POPULAÇÃO DE IDOSOS FREQUENTADORES DA “CASA DO IDOSO” NA CIDADE DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, sob a responsabilidade do pesquisador principal Eduardo Santos Felismino, mestrado regularmente matriculado no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Santo Amaro – UNISA (turma 2020), sob a orientação do Professor Doutor André Luis Lacerda Bachi. Estes esclarecimentos estão sendo apresentados para solicitar sua participação livre e voluntária no desenvolvimento deste projeto. O projeto tem como principal objetivo determinar a presença de sarcopenia numa população de idosos frequentadores da “Casa do Idoso” na cidade de São José dos Campos. Além disso, também serão preconizadas as seguintes avaliações: a presença e severidade da sarcopenia através da força muscular; da quantificação de massa muscular; da função muscular, bem como correlacionar a presença e severidade da sarcopenia com os níveis de atividades físicas diárias e padrão alimentar. Para podermos responder aos nossos objetivos, os voluntários idosos serão selecionados e recrutados junto ao Instituto Brasileiro de Ensino e Pesquisa em Imunologia Pulmonar e Exercício (IBEPIPE), localizado na cidade de São José dos Campos, que já vem desenvolvendo estudos com a população de idosos frequentadores da “Casa do Idoso” na cidade de São José dos Campos. Com base no banco de dados do IBEPIPE foi possível realizar o cálculo amostral, utilizando o programa G*Power, e para este projeto pretende-se convidar a participar 400 idosos de ambos os sexos, com idade entre 60 a 95 anos. Os participantes voluntários do estudo serão submetidos às seguintes avaliações: antropométricas [medida da massa corporal, estatura, do índice de massa corporal (IMC) e da circunferência da cintura e da panturrilha]; da composição corporal (concentração de gordura e massa muscular) através de bioimpedância; da força muscular através de dinamômetro de mão (Handgrip); da capacidade funcional através da velocidade de marcha e Bateria Curta de Testes para Desempenho Físico; do nível de atividade física através do questionário IPAQ (Questionário Internacional de Atividade Física), e padrão alimentar através dos questionários MAN (Mini Avaliação Nutricional) e de Frequência Alimentar. Todas essas avaliações serão realizadas por profissionais habilitados garantindo total segurança às voluntárias do estudo. Vale destacar que os dados obtidos serão inicialmente utilizados para o desenvolvimento do presente estudo. Contudo, caso seja necessária comprovação dos resultados, ou mesmo para que outras análises possam ser realizadas, os dados poderão ser utilizados, sendo neste caso solicitado sua permissão. Os riscos decorrentes de sua

participação na pesquisa são mínimos, podendo haver pequeno desconforto ou cansaço no momento da coleta dos dados da capacidade funcional. Com relação aos demais procedimentos a serem realizados não haverá risco nenhum. Contudo, caso haja manifestação de constrangimento ao se expor durante a realização da coleta dos dados ou mesmo alterações na autoestima provocadas pela evocação de memórias sobre sua condição clínica podem configurar-se como menor risco. Diante disso, salientamos que no momento em que sejam percebidas ou apresentadas tais manifestações e/ou alterações, o caso será comunicado aos responsáveis pela “Casa do Idoso” para que o(a) Sr(a) receba assistência clínica psicológica. Vale esclarecer que esta assistência já é oferecida aos idosos frequentadores deste local. Além disso, será garantido sigilo a respeito dos nomes e dos resultados individuais de cada participante, sendo os dados obtidos neste estudo agrupados para confecção dos relatórios, dissertações e artigos científicos. Com relação ao acompanhamento clínico, este já é realizado pelos médicos geriatras da “Casa do Idoso”, que também terão total acesso aos respectivos resultados. Se o(a) Sr(a) aceitar participar, estará contribuindo não só compreender melhor como se dão as alterações na função e massa muscular, bem como na capacidade funcional do idoso, mas também poderá permitir a implantação de novas estratégias de promoção de saúde desta população que podem levar a melhora do bem estar e da capacidade de realizar as atividades diárias. Esta garantida a liberdade da retirada de Vosso consentimento a qualquer momento e interrupção no estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de qualquer benefício que o sujeito de pesquisa tenha obtido junto à instituição, antes, durante ou após o período deste estudo. Em nenhum momento seu nome será divulgado no estudo. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação, se existir quaisquer despesas adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente relacionado aos procedimentos deste estudo (nexo causal comprovado) a qualquer tempo, ficam asseguradas indenizações por danos eventuais. O pesquisador responsável é o mestrando Eduardo Santos Felismino, que poderá ser encontrada no Campus I da Universidade de Santo Amaro – UnNISA, no endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim da Imbuías, SP.: Tel: 2441-8687. Se houver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP – UNISA) – Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340, Jardim das Imbuías, SP – Tel.: 2441-8687. Uma via deste Termo de Consentimento ficará em seu poder. São Paulo, ____/____/____.

Eduardo Santos Felismino Pesquisador responsável/mestrando Se você concordar em participar desta pesquisa assine no espaço determinado abaixo e coloque seu nome e o nº de seu documento de identificação. Nome do participante:

____	Documento	de	Identificação	RG/RNE
Declaro, que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante para participar neste estudo, conforme preconiza a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, IV.3 a 6. -----				
Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo			Data ____/____/____	
Assinatura dos demais pesquisadores			Data ____/____/____	

B – Termo de Compromisso e confiabilidade

TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE (Elaborado de acordo com a Resolução 466/2012-CNS/CONEP)

Em referência a pesquisa intitulada **(A MELHOR RESPOSTA À VACINAÇÃO CONTRA O VÍRUS DA GRIPE EM IDOSOS FISICAMENTE TREINADOS ESTÁ ASSOCIADA A REDUÇÕES DE IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS PARA CITOMEGALOVÍRUS, BEM COMO A MELHORIAS NOS PERFIS INFLAMATÓRIOS E DE CÉLULAS TCD8+)**, eu, Eduardo Santos Felismino e minha equipe, composta por **(André Luis Lacerda Bachi e o Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira)**, comprometemo-nos a manter em anonimato, sob sigilo absoluto, durante e após o término do estudo, todos os dados que identifiquem o sujeito da pesquisa, usando apenas para divulgação os dados inerentes ao desenvolvimento do estudo.

Asseguro o compromisso com a privacidade e a confidencialidade dos dados utilizados, preservando integralmente o anonimato e a imagem do participante, bem como a sua não estigmatizarão.

Asseguro também, a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou da comunidade, inclusive em termos de autoestima, de prestígio e/ou econômico financeiro.

Comprometemo-nos também com a destruição, após o término da pesquisa, de todo e qualquer tipo de mídia que possa vir a identificá-lo tais como filmagens, fotos, gravações, questionários, formulários e outros.

Local, data: ___/___/___

Pesquisador

Responsável:

.....

Assinatura e carimbo

Assinatura de todos os membros da equipe

Função Atual: _____

_____ /

_____ /

_____ Titulações Acadêmicas:

_____ Carga Horária Semanal: _____ h/aula +

_____ h/atividade

_____ =

_____ h/semanais Cursos:

_____ Disciplina (s)/Atividade (s):

3. Dados sobre a solicitação:

Duração: _____ dias/meses. Vigência ____ / ____ / ____ a ____ / ____ /

_____ Área de concentração: () Ciências Biológicas e da
Saúde () Ciências Exatas e Tecnológicas () Ciências Humanas e Sociais.

Grupo _____ de _____ Pesquisa:

Linha _____ de _____ Pesquisa:

Título _____ do _____ Projeto:

São Paulo, _____ de _____ de _____

Nome do Orientador _____