

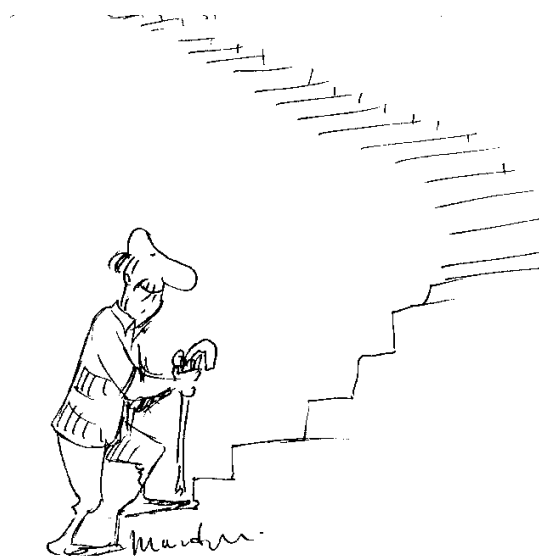
Universidade Federal de Minas Gerais

Escola de Educação Física Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Departamento de Fisioterapia

Programa de Pós Graduação em Ciências da Reabilitação

Impacto de uma Intervenção fisioterápica em idosas com síndrome de fragilidade sobre as células T regulatórias, a produção de citocinas e fatores neurotróficos.



Fernanda Matos Coelho

Belo Horizonte

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Impacto de uma Intervenção fisioterápica em idosas com síndrome de fragilidade sobre as células T regulatórias, a produção de citocinas e fatores neurotróficos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Reabilitação, da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação.

Área de Concentração: Desempenho Funcional Humano.

Linha de Pesquisa: Saúde e Reabilitação do Idoso

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leani Souza Máximo Pereira

Co-Orientador: Prof Dr. Mauro Martins Teixeira

Doutoranda: Fernanda Matos Coelho

“Os problemas significativos com os quais nos deparamos não podem ser resolvidos no mesmo nível de pensamento em que estávamos quando os criamos.”

Albert Einstein

Dedicatória

**Aos meus avós, principalmente minha vovó Lourdes que sabiamente me
incentivou com seu exemplo a ser amante da leitura...**

Agradecimientos

O agradecimento é um momento de reflexão...

Assim tenho que agradecer às idosas que participaram como voluntárias dessa tese, pois demonstram a cada dia que o encanto transparece no rosto harmonioso e no olhar sereno, tão bonito em qualquer idade...

A Leani, minha querida orientadora, amiga, incentivadora e exemplo de pesquisadora em todos os sentidos...

Ao Mauro Martins Teixeira, meu co-orientador, pai científico, que acompanhou todo o processo desde os primeiros passos, ainda na iniciação, pelas discussões científicas, políticas e opiniões críticas que nos fazem crescer...

A minha companheira, cara-metade Daniele Sirineu... por tornar um trabalho árduo muito mais prazeroso e por entender e complementar minhas idéias. Esse foi só o começo de uma longa parceria científica...

A Lygia Pacini pelo trabalho desenvolvido em conjunto e pela companhia no jantar em Montparnasse... Bons momentos

Ao Juscélio pelos momentos e boas risadas nas avaliações isocinéticas... força, força, força.

A Érica Leandro Marciano minha co-co-orientadora que me deu grande apoio nas análises de FACS e nos assuntos de Gueri-Gueri.

Ao Caio Fagundes, "ni", nem tenho palavras para agradecer os abanos, conversas, discussões imunológicas, conselhos e principalmente seu bom humor incondicional. Você é o cara!

Agradeço aos amigos do Imunofar, e suas subdivisões (Laboratório da Dani e da Vanessa, minhas chuchuzinhas) o Flávio Amaral e a Vívian meus irmãozinhos, a Neuroimunofar e ao Prof Antônio e Lucíola Muito obrigada !

A Danielle Gomes, pelas discussões estatísticas que foram de grande auxílio.

Ao professor Sérgio por ter me ensinado, na disciplina abordagem ecológica à percepção e ação a questionar e a expandir as possibilidades de análise. Não há mudança sem instabilidade...

A Laríssa, Luiza e Stephanie minhas alunas, por me ajudarem e por compreenderem minhas ausências...

Marilane, por sempre ser tão disponível no que precisei dentro do colegiado.

Agradeço a minha família toda, Tios (as), Primos (as), Tetê você faz parte dessa família...

Mãe, você é luz, raio, estrela e luar,

Pai, positivo e operante? Sempre perguntando: mas o que é mesmo que você faz na Federal?

Amandinha, amor da minha vida daqui até a eternidade...

Paulinho, não contava com minha astúcia? O quê, o quê, o quê?

Mary, cunhadinha...

... e ao Gui, porque quando acho que não vou conseguir ainda é a sua voz que escuto dizendo RAÇA!

Aos meus chuchuzinhos (amigos do peito), Dri, Aninha, Juninha (marida você sabe que por você... por você...), Flay, Ericat, Gu, Simone, O Chu, Diogo, Carolady, Alexandre (personow) que me cativaram . Por serem boas companhias para rir, chorar, falar besteira, correr, dançar esquisito, e expressar o lado metalzinho (essa é pra você Fefê)... Enfim por serem o colorido que faz a diferença...

Ao OLLS, minha sala de Fisioterapia, massagens e banhos terapêuticos e ao YANTRA, e especialmente a Gi, eu que encho a boca para falar de você...

A Faculdade Pitágoras pela oportunidade de desenvolver habilidades didáticas essenciais... Especialmente aos coordenadores (Brandão e Xavier), professores (Linaena e Breno) e aos alunos...

Ao Jens, pela amizade e pela oportunidade de continuar os estudos sob sua orientação.

Agradeço à banca, por ter aceitado o convite e as agências financiadoras;

Agradeço a Deus e a todos que tiveram participação nesse projeto, espero contar com vocês sempre! Pois o fim de uma etapa é sempre o começo de outra...

Sumário

Prefácio	11
Resumo	13
Abstract	16
1. Introdução	20
1.1 Síndrome da Fragilidade.....	20
1.2 Imunosenescência	21
1.3 Células T reguladoras	24
1.4 Marcadores Biológicos	25
1.4.1 Interleucina-6.....	26
1.4.2 Fatores Neurotróficos.....	30
1.5 Sarcopenia.....	31
1.6 Exercícios Físicos	32
2. Objetivos do estudo	36
2.1. Geral:.....	36
2.2. Específico:	36
Pergunta do estudo.....	37
3. Metodologia	39
3.1. Amostra.....	39
□ Resultados do piloto para cálculo amostral	39
3.2. Critérios de Inclusão	39
3.3. Critérios de Exclusão.....	40
3.4. Instrumentos e procedimentos	40
□ Dados Clínicos sócio-demográficos.....	40
□ Massa Corporal	41
□ Nível de Atividade Física	41
□ Força muscular de preensão manual e dos extensores do joelho.....	41
□ Timed Up and Go	44
□ Escala de Depressão Geriátrica.....	44
□ Mini-Exame do Estado Mental.....	45
□ Exercícios físicos.....	45
3.5. Imunofenotipagem das células Treg	47
3.6. Medidas de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10.....	49
3.7. Medidas de BDNF, GDNF e NGF	50
3.8. Análise estatística	51
Artigo 1	52
Physical Therapy intervention increases T regulatory cells frequency in Pre-Frail elderly women.	53
Artigo 2	77
Physical Therapy intervention increases plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in pre-frail elderly women.	78
4. Referencias Bibliográficas	107
Anexo 1	116
Anexo 2	125
Anexo 3	131
Mini-curriculo	132

Prefácio

Prefácio

A presente tese de doutorado foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Universidade Federal de Minas Gerais. Sua estrutura compreende 6 capítulos. O primeiro capítulo contém a introdução que descreve a problematização do tema e os achados previamente descritos na literatura. No segundo encontram-se os objetivos e a pergunta da tese. No terceiro capítulo, a metodologia utilizada está descrita detalhadamente. Os capítulos quarto e quinto contêm os artigos científicos, produtos finais desta tese, intitulados: “**Physical Therapy intervention increases T regulatory cells frequency in Pre-Frail elderly women**” redigido e formatado de acordo com as normas da revista *Physical Therapy* para a qual o artigo deverá ser enviado para publicação após a tese e “**Physical Therapy intervention increases plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in pre-frail elderly women**” submetido para a revista *Neurorehabilitation and Neural Repair*. No oitavo capítulo são apresentadas as considerações finais relacionadas aos resultados encontrados. Em seguida estão incluídas as referências bibliográficas utilizadas na parte inicial da tese e os anexos. No final desta tese encontra-se o mini-curriculo da doutoranda com as atividades acadêmicas desenvolvidas e a produção científica deste período.

Resumo

Resumo:

A fragilidade trata-se de uma síndrome clínica, de natureza multifatorial, caracterizada pela diminuição das reservas de energia e pela resistência reduzida aos estressores, resultando no declínio acumulativo dos sistemas fisiológicos. Alterações do sistema imunológico relacionadas à idade em conjunto são denominadas de imunossenescência. Algumas mudanças associadas à idade parecem ter impacto no fenótipo dos linfócitos T justificando muitas das mudanças na rede de produção de citocinas. Nos dias atuais, as funções das células T reguladoras (Treg) e os mecanismos envolvidos nas enfermidades imunológicas têm sido amplamente discutidos. Evidências recentes demonstram que a atividade física moderada modula a síntese de citocinas, que são importantes reguladores da resposta imunológica, podendo desacelerar o processo de imunossenescência. Fatores neurotróficos também parecem estar envolvidos nessa rede de modificações imunológicas que levam ao aumento de morbidade e mortalidade associada ao processo de envelhecimento. Dessa forma, pode-se pressupor que intervenções que promovam o fortalecimento de grupos musculares poderiam modificar os índices de citocinas contribuindo para a melhora da velocidade de marcha e do desempenho funcional dos idosos. Assim, o presente estudo apresentou como objetivos investigar em idosas com síndrome da fragilidade o papel de um protocolo de intervenção fisioterápica com exercícios resistidos para membros inferiores elaborados e supervisionados pelos pesquisadores sobre parâmetros funcionais, frequência das células Treg, produção de citocinas e fatores neurotróficos. Para alcançar esses objetivos foram realizados dois estudos. No primeiro estudo foram avaliadas as células Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) por citometria de fluxo e a produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ e IL-10) no sobrenadante da cultura de células

mononucleares do sangue periférico (PBMC) com e sem estímulo (anti-CD3 e anti CD28) por ELISA. Como resultado principal foi observado que idosas frágeis tinham uma menor frequência de células Treg em comparação com as pré-frágeis, sendo que a intervenção promoveu um aumento na frequência dessas mesmas células Treg. Outra observação importante está associada aos níveis das citocinas, que foram modificados após a intervenção fisioterápica. Houve uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias frente ao estímulo com aumento da produção de IL-10 no momento pós-intervenção. No segundo estudo, os níveis plasmáticos de fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) foram quantificados por ELISA. Foi demonstrado que os níveis de BDNF foram significativamente maiores em idosas não-frágeis em comparação com idosas pré-frágeis, sendo que o protocolo de intervenção fisioterápica aumentou os níveis de BDNF. Os resultados dos dois estudos indicam que a fragilidade está associada a uma modificação da resposta imunológica, sendo acompanhada da redução da frequência de células Treg, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias frente a um estímulo e diminuição dos níveis de BDNF plasmáticos. O protocolo de intervenção fisioterápica foi capaz de influenciar este perfil, levando ao aumento da frequência de células Treg, aumento da produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e o fator neurotrófico, BDNF, que tem papel neuroprotetor, sugerindo em conjunto que exercícios físicos podem ser capazes de modificar este fenótipo de fragilidade.

Palavras chaves: Síndrome da Fragilidade, força muscular, células T regulatórias e citocinas.

Abstract

Abstract:

Frailty is a clinical syndrome of multifactorial nature, characterized by the depletion of reserves of energy and reduced resistance to stress, conditions which result from the cumulative decline of physiological systems. The changes of immune system related to aging process together are called immunosenescence. Some of these changes associated with age seem to have an impact in T lymphocytes phenotype justifying many of the changes in cytokine production network. Nowadays, regulatory T cells (Treg) functions and mechanisms in the involved in immunological diseases have been widely argued. Recent evidences demonstrate that the moderate physical activity modulates synthesis of cytokines, which are important regulators of the immunologic response, being able to decelerate the immunosenescence process. Neurotrophic factors also seem to be involved in this network of immunological modifications that leads to increase of morbidity and mortality associated with aging process. This way, it can be estimated that interventions that promote the reinforcement of muscle groups could modify the indices of cytokines contributing for the improvement of the gait speed and functional performance of elderly. Thus, the present study aim to investigate in aged with frailty syndrome the role of physical therapy protocol of exercises resisted for inferior members elaborated and supervised by the researchers on functional parameters, frequency of the Treg cells, cytokine production and neurotrophic factors. To reach these objectives two studies had been carried through. In the first study the Treg cells (CD4+CD25+FOXP3+) were evaluated by flow cytometry and the production of cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ and IL-10) in the supernatant of mononuclear cells of the peripheral blood (PBMC) culture with and without stimulus (anti-CD3 and anti CD28) through

ELISA. As main result was observed that frail elderly women had lesser frequency of Treg cells in comparison with the pre-frail ones, also intervention promoted an increase in the frequency of these same Treg cells. Another important comment is associated with the levels of the cytokines that were modified by physical therapy intervention; there was a reduction of the production of pro-inflammatory cytokine front to the stimulus with increase in the production of IL-10 at the moment after-intervention. In the second study, the plasmatic levels of neurotrophic factors (BDNF, GDNF and NGF) had been quantified by ELISA. It was demonstrated that the BDNF levels had been significantly higher in aged non-frail in comparison with pre-frail; also intervention promote increased in the BDNF levels. The results of the two studies indicate that the frailty is associated with an modification of the immunological response, and accompanied of the reduction of the frequency of Treg cells, increase of the production of pro-inflammatory cytokines front to a stimulus and reduction of the BDNF plasma levels. The physical therapy protocol was able to influence this profile, leading to the increase of the frequency of Treg cells, increase of the IL-10 production, an anti-inflammatory cytokine, and the neurotrophic factor, BDNF, that has an neuroprotective role, suggesting all together that physical exercises may be able to modify this frailty phenotype. **Key words:** Frailty Syndrome, muscle strength, regulatory T cells and cytokines.

Introdução

1. Introdução

1.1 Síndrome da Fragilidade

A população de idosos no Brasil vem aumentando de forma acelerada desde o início da década de 60. No final do século passado, a população com mais de 65 anos correspondia a 8,7 milhões de brasileiros. A projeção para 2020 é que haverá um idoso para cada grupo de 13 jovens (BERQUÓ, 1996). Projeções demográficas apontam que até 2050 a população de idosos represente 14,2% da população brasileira (CHAIMOWICZ, 1997; VERAS, 2003). Atualmente, o perfil dos idosos é definido com uma maior prevalência de mulheres, viúvas, com baixa renda e baixa escolaridade (GARRIDO *et al.*, 2002). Este fato constitui o fenômeno da feminilização da velhice segundo os especialistas em gerontologia (BERQUÓ, 1996; CHAIMOWICZ, 1997; VERAS, 2003; GARRIDO *et al.*, 2002).

A velhice é associada às formas peculiares de alterações genéticas, biológicas, sociais, estruturais e psicológicas, as quais contribuem para a configuração de padrões de velhice normal, ótima e patológica. Tanto a velhice saudável ou bem sucedida, denominada de senescência ou a velhice associada às doenças ou senilidade, são variáveis, individuais e com diferentes manifestações e desfechos na vida de pessoas e populações (WALSTON *et al.*, 2006).

A fragilidade trata-se de uma síndrome clínica, de natureza multifatorial, caracterizada pela diminuição das reservas de energia e pela resistência reduzida aos estressores, condições essas que resultam do declínio acumulativo dos

sistemas fisiológicos (FRIED *et al.*, 2004). A expressão mais elaborada do conceito de fragilidade foi proposta pelo grupo do Centro de Envelhecimento e Saúde da Universidade John Hopkins, o qual, em estudos coordenados por Fried *et al.*, definiram a síndrome da fragilidade como uma síndrome de declínio de energia que ocorre em espiral, embasado por um tripé de alterações relacionadas ao envelhecimento, composto principalmente por sarcopenia, desregulação neuroendócrina e disfunção imunológica (FRIED *et al.*, 2001). Esse grupo de pesquisadores propôs também um fenótipo da fragilidade com cinco critérios: 1) Perda de peso não intencional ($\geq 4,5\text{kg}$ ou $\geq 5\%$ do peso corporal no ano anterior); 2) Exaustão avaliada por auto-relato de fadiga, indicado por duas questões da *Center for Epidemiological Studies – Depression* (CES-D); 3) Diminuição da força de preensão medida com dinamômetro na mão dominante e ajustada ao sexo e ao índice de massa corporal (IMC); 4) Baixo nível de atividade física medido pelo dispêndio semanal de energia em kcal, ajustado segundo o sexo (com base no auto-relato das atividades e exercícios físicos realizados, avaliados pelo *Minnesota Leisure Time Activities Questionnaire*), e 5) Lentidão medida pela velocidade da marcha indicada em segundos (distância de 4,6 m, ajustada segundo sexo e altura) (FRIED *et al.*, 2001). Indivíduos com três ou mais desses critérios positivos seriam classificados como frágeis, aqueles com um ou dois critérios como pré-frágeis e os não frágeis os idosos que não apresentassem nenhum dos critérios descritos.

1.2 Imunosenescência

O processo de envelhecimento fisiológico normalmente vem acompanhado de uma série de alterações peculiares e individuais em órgãos e sistemas (LINTON *et al.*, 2004). As alterações do sistema imunológico relacionadas à idade são denominadas de imunossenescência. O envelhecimento fisiológico está relacionado a uma ativação crônica do processo inflamatório, em que o organismo encontra-se em um grau sublimiar de inflamação (KRABBE, 2004; FERRUCCI, 1999). Há o aumento de duas a quatro vezes nos índices plasmáticos de mediadores inflamatórios tais como as citocinas interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-10, proteínas da fase aguda, como a proteína C reativa (FERRUCCI, 1999).

Com o envelhecimento, podemos citar algumas alterações dinâmicas do sistema imunológico, como a involução tímica, um déficit nas respostas humorais e inatas, além da redução da imunidade mediada pelas células (PAWELEC, 2002). O impacto do envelhecimento sobre o sistema imunológico pode ser demonstrado também pela modificação da proliferação de células T, produção de citocinas e distribuição de linfócitos (PAWELEC, 2002).

As células T desenvolvem-se no timo, e as células B desenvolvem-se na medula óssea nos adultos, ou no fígado, nos estágios fetais. Existem duas classes principais de células T - as células T citotóxicas e as células T auxiliares ou *helper* (Th). Quando ativada por uma célula apresentadora de antígeno, uma célula T auxiliar virgem pode diferenciar-se em dois tipos distintos de células T auxiliares efetoras, denominadas Th1 e Th2. As células Th1 auxiliam principalmente a ativação de macrófagos e células T citotóxicas, enquanto as células Th2 auxiliam na ativação das células B (COLLAZIOL *et al.*, 2004). As

células T auxiliares efetoras secretam uma série de proteínas sinalizadoras denominadas citocinas que atuam como mediadores locais. Também possuem uma variedade de proteínas co-estimuladoras associadas às membranas. As células T auxiliares podem migrar para sítios distantes, mas podem agir localmente sobre as células vizinhas. Se a célula T auxiliar efetora diferenciar-se em uma célula Th1 ela irá secretar o interferon gama (**IFN- γ**) e o fator de necrose tumoral alfa (**TNF- α**) e irá ativar os macrófagos a fagocitarem antígenos. Entretanto, se a célula T auxiliar efetora diferenciar-se em uma célula Th2 ela irá secretar interleucinas 4, 5, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) e irá defender o organismo principalmente contra patógenos extracelulares (SANDMAND *et al.*, 2002). Uma vez formadas as células Th1 ou Th2, ocorre inibição da diferenciação do outro tipo de célula T auxiliar. O IFN- γ produzido pelas células Th1 inibe o desenvolvimento das células Th2, enquanto a IL-4 e a IL-10 produzidas pela Th2 inibem o desenvolvimento das células Th1. Assim a escolha inicial da resposta é reforçada durante a execução dessa resposta (ABBAS *et al.*, 2005).

O balanço entre as citocinas induzidas pelas células Th1 e Th2 está relacionado com a regulação de diversas respostas imunes, e está envolvida com a patogênese de diferentes doenças infecciosas como, por exemplo, HIV, tuberculose e leishmaniose (SANDMAND *et al.*, 2002; SHURIN *et al.*, 2007). Sandmand *et al.* encontraram algumas evidências comprovando a hipótese de que durante o envelhecimento o balanço Th1/Th2 estaria alterado resultando numa polarização da resposta tipo Th2. Estas mudanças no fenótipo dos linfócitos T parecem justificar muitas das mudanças na rede de citocinas associadas à idade (MILLER, 1996). Assim, é possível que a alteração na produção de citocinas durante o processo de envelhecimento seja o reflexo de

um aumento do número de linfócitos T ativados (BRUUNSGAARD *et al.*, 2000). Esta disfunção do sistema imunológico vem sendo evidenciada na literatura como um dos fatores que poderia influenciar também a sarcopenia (JANSSEN *et al.*, 2004).

1.3 Células T reguladoras

Nos dias atuais, as funções das células T reguladoras (**Tregs**) têm incorporado uma nova visão para a explicação das enfermidades imunológicas questionando o paradigma Th1/Th2 e, conseqüentemente sua avaliação é considerada muito promissora como opção terapêutica (DAMOISEAUX, 2006). Células Tregs CD4⁺ podem ser subdivididas em dois tipos principais: as naturais e as adaptativas (nTregs e aTregs). O que distingue os dois tipos são as vias de desenvolvimento e mecanismos de supressão diferentes (WING & FEHERVARI *et al.*, 2006). As células nTregs são geradas no timo e migram para a periferia onde constituem aproximadamente de 5-10% de todas as células CD4⁺ periféricas. Elas constitutivamente expressam o marcador de superfície CD25 (receptor de alta afinidade de IL-2) (FURTADO, *et al.*, 2002; SAKAGUCHI & SAKAGUCHI *et al.*, 1995). Além do marcador fenotípico CD25, várias outras moléculas de superfície celular têm sido associadas às células nTregs na função de prevenir a autoimunidade e induzir a tolerância: a isoforma do antígeno comum dos leucócitos (CD45RB^{low}), a proteína 4 associada aos linfócitos T citotóxicos (CTLA4), a integrina $\alpha\beta 7$, o receptor da família do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (GITR), neuropilin-1 e o fator de transcrição

foxp3 (POWRIE & LEACH *et al.*, 1993; SHIMIZU & YAMAZAKI *et al.*, 2002; FONTENOT & GAVIN *et al.*, 2003; BRUDER & PROBST-KEPPER *et al.*, 2004).

De todos os marcadores citados o fator de transcrição *foxp3* tem sido considerado o padrão ouro para identificação da população de células Tregs. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA de células eucarióticas para permitir que haja uma ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA, permitindo assim sua transcrição e a futura tradução. O *foxp3* tem sido exhaustivamente estudado, pois mutações no gene FOXP3 resultam em completa ausência de Tregs e o espontâneo desenvolvimento de doenças auto imunes de órgãos endócrinos, doença inflamatória intestinal, dermatite atópica e infecções fatais. A expressão de *foxp3* é quase totalmente específica das nTregs de camundongos, entretanto sua expressão em seres humanos é menos restrita. Diferente dos outros marcadores fenotípicos das nTregs, que por vezes aparecem em linfócitos T efetores, o fator de transcrição *foxp3* não foi observado em nenhuma subpopulação de células T (DAMOISEAUX, 2006).

1.4 Marcadores Biológicos

Biomarcadores ou marcador biológico consiste em uma característica que é objetivamente avaliada ou mensurada, funcionando como um indicativo da presença ou extensão de um processo biológico, processo patológico ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica (HENLEY *et al.*, 2005; MAREK *et al.*, 2008).

O desequilíbrio na produção e liberação de citocinas e a manutenção de um estado pró-inflamatório contribuem para uma maior predisposição a doenças infecciosas e para o aparecimento ou agravamento de condições crônicas, como hipertensão e doenças reumáticas (KRABBE *et al.*, 2004 ; MAGGIO *et al.*, 2006). Nesse aspecto, o aumento de mediadores inflamatórios seria, então, um caminho comum entre o processo de envelhecimento e a ocorrência de doenças relacionadas à idade.

Os índices de mediadores inflamatórios circulantes e sua importância clínica têm sido investigados em amostras populacionais, tanto em estudos transversais quanto nos longitudinais. A IL-6 vem sendo foco de crescente interesse científico dentre as citocinas por ter sido um dos principais marcadores de alterações e condições relacionadas ao envelhecimento, além do importante papel na homeostasia do sistema imunológico (ERSHLER; 1993).

Fried e colaboradores em 2004 demonstraram que a inflamação observada em idosos frágeis parece estar primariamente relacionada ao processo de sarcopenia. Corroborando estes resultados Ferruci e colaboradores em 1999 demonstraram que a relação entre IL-6 e perda de função estava associada a perda de força muscular. Além disso, proteína C reativa, IL-6 e o receptor tipo II do TNF- α correlacionaram negativamente com a taxa de síntese de proteína muscular (TOTH *et al.*, 2005) dando suporte à hipótese que níveis inflamatórios sub-clínicos estão envolvidos no desenvolvimento da sarcopenia.

1.4.1 Interleucina-6

A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular de 20 a 30 kDa, dependendo de sua origem celular, com diversas atividades biológicas em diferentes células e tecidos (MAGGIO *et al.*, 2006). Sob condições fisiológicas, a principal fonte de IL-6 são as células do sistema imunológico (linfócitos e macrófagos), células endoteliais (MAGGIO *et al.*, 2006) e fibroblastos (PETERSEN *et al.*, 2005; SHKURATOVA *et al.*, 2004). Entretanto, verificou-se que em condições de repouso cerca de 10 a 35% dos níveis basais de IL-6 é produzido pelo tecido adiposo (MOHAMED-ALI *et al.*, 1997). Outras células que também expressam IL-6 incluem os osteoblastos, os neutrófilos, os eosinófilos, as células músculo-esqueléticas, dentre outras (PETERSEN *et al.*, 2005; FEBBRAIO *et al.*, 2002). Diferentes estímulos, incluindo outras citocinas e toxinas podem induzir a produção de IL-6 (MAGGIO *et al.*, 2006), sendo os principais desencadeadores a IL-1 β e o TNF- α (PETERSEN *et al.*, 2005).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica multifuncional, com ação pró- e anti-inflamatória. É associada ao controle e coordenação de respostas do sistema imunológico, além de atuar nos sistemas hematopoiético, nervoso e endócrino e participar também do metabolismo ósseo (KRABBE *et al.*, 2004; PETERSEN *et al.*, 2005; SHKURATOVA *et al.*, 2004).

O papel fisiológico da IL-6 tem sido amplamente estudado no contexto da resposta de fase aguda (MAGGIO *et al.*, 2006; SHKURATOVA *et al.*, 2004). Na inflamação aguda, a IL-6 promove a diferenciação das células B em células produtoras de anticorpos e estimula a proliferação e ativação das células T (PETERSEN *et al.*, 2005). Além disso, modula a síntese de proteínas da fase

aguda (tais como proteína C reativa e o fibrinogêneo) pelos hepatócitos (MAGGIO *et al.*, 2006; SHKURATOVA *et al.*, 2004) e induz a produção de neutrófilos na medula óssea (PETERSEN *et al.*, 2005).

Todavia, estudos sugerem que uma das principais funções da IL-6 é a auto limitação da resposta inflamatória. A IL-6 tem ação inibidora na expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , ao aumentar a síntese do receptor antagonista da IL-1 (IL-1Ra) e os receptores de TNF. Assim, a IL-6 concomitantemente regula atividades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, contribuindo tanto para o desenvolvimento quanto para a resolução da resposta inflamatória (MAGGIO *et al.*, 2006; PETERSEN *et al.*, 2005).

A produção de IL-6 é normalmente baixa, e seus índices séricos freqüentemente não são detectáveis em indivíduos jovens, exceto na presença de traumas, infecções ou doenças agudas (SHKURATOVA *et al.*, 2004; BEHARKA *et al.*, 2001). No entanto, estudos transversais e longitudinais demonstraram que a concentração de IL-6 aumenta no plasma e no sobrenadante de culturas de células mononucleares sanguíneas de indivíduos idosos (KRABBE *et al.*, 2004; FERRUCCI *et al.*, 2005; GRIMBLE, 2003; FORSEY *et al.*, 2003; HADDAD *et al.*, 2005). Ferruci e colaboradores verificaram que os valores de IL-6 variaram de 1,4 pg/ml (homens) e 1,1 pg/ml (mulheres), no grupo de idosos com idade entre 65-74 anos, para 3,5 pg/ml (homens) e 2,1 pg/ml (mulheres) em idosos com idade igual ou acima de 85 anos.

Os mecanismos fisiológicos pelos quais ocorre o aumento dos índices plasmáticos de IL-6 ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, alguns autores apontam a influência de hormônios esteróides no controle da

expressão dessa citocina. O declínio na produção e nos níveis circulantes de estrogênios, testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e o sulfato de DHEA com a idade, causariam a perda da regulação da expressão da IL-6, resultando em um aumento de seus índices (MAGGIO *et al.*, 2006; SHKURATOVA *et al.*, 2004). Outros fatores, relacionados ao aumento desse mediador seriam o tabagismo, a obesidade (SHKURATOVA *et al.*, 2004; GRIMBLE, 2003; JENNY *et al.*, 2002) e o estresse psicológico (KIECOLT-GLASER *et al.*, 2003).

Uma vez que a IL-6 exerce um papel central na homeostase dos sistemas imunológico e neuroendócrino, o desequilíbrio em sua produção pode levar a conseqüências deletérias ao organismo. Em indivíduos idosos, índices elevados de IL-6 mostraram-se inversamente relacionados à massa e a força muscular, ao desempenho funcional, ao equilíbrio, à velocidade de marcha e a maior mortalidade (FERRUCCI *et al.*, 1999; HADDAD *et al.*, 2005; MORLEY *et al.*, 2004; SCHAAP *et al.*, 2006; MORLEY *et al.*, 2006). Em uma coorte de 627 mulheres idosas apresentando incapacidades (de moderada a grave), Ferrucci e colaboradores verificaram que aquelas com índices plasmáticos de IL-6 acima de 3.1 pg/ml apresentaram maior redução na força muscular dos extensores de joelhos e também na capacidade de realizar atividades de vida diária. Barbieri e colaboradores em uma amostra de 526 indivíduos com idade entre 20 e 102 anos, verificaram o aumento nos índices plasmáticos de IL-6 e a diminuição dos índices do fator de crescimento de insulina (IGF-I) entre os indivíduos mais velhos (BARBIERI *et al.*, 2003). O aumento dos índices plasmáticos da IL-6 foram preditores independentes da perda da potência muscular dos membros inferiores e da força de preensão manual. Entretanto, esse efeito deletério ocorreu apenas para índices plasmáticos maiores que 1,73 pg/ml (BARBIERI *et al.*, 2003). Quanto

à mobilidade, Pennix e colaboradores estudaram uma coorte de 2979 homens e mulheres idosos sem alterações funcionais, acompanhados por um período de 30 meses. Esses autores verificaram que altos índices de IL-6 (2,18 pg/ml), TNF- α (3,36 pg/ml), e proteína C reativa (2,31 mg/l) foram preditores independentes para a incidência de limitações para a deambulação e a tarefa de subir escadas.

No entanto, o mecanismo pelo quais as citocinas contribuem para o declínio funcional em idosos ainda permanece incerto. Evidências indicam para uma ação catabólica dessa citocina, com a redução da massa e força musculares, estando relacionada à sarcopenia (HADDAD, F. et al., 2005; BAUTMANS *et al.*, 2005; DOHERTY, 2003), por sua vez, determinante na perda da mobilidade funcional, quedas, dependência e fragilidade (FRIED *et al.*, 2004; ROUBENOFF *et al.*, 2003; FERRUCCI *et al.*, 2002; VISSER *et al.*, 2005; VISSER *et al.*, 2002; ZHONG *et al.*, 2007).

1.4.2 Fatores Neurotróficos

Os fatores neurotróficos constituem uma família de polipeptídeos estruturalmente e funcionalmente semelhantes, incluindo o fator de crescimento do nervo (NGF, do inglês "*Nerve Growth Factor*"), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês "*Glial-Derived Neurotrophic Factor*"), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês "*Brain-Derived Neurotrophic Factor*"), neurotrofina 3 (NT-3) e neurotrofina 4/5 (NT-4/5). Estes fatores neurotróficos exercem suas funções sobre as células alvo através de ligações com receptores de membrana específicos da família dos receptores da tirosina cinase (TrK),

atuando sobre a diferenciação, o desenvolvimento, a manutenção e a sobrevivência das estruturas do SNC e sistema nervoso periférico (BAQUET *et al.*, 2005).

O BDNF e outros fatores neurotróficos são importantes para a sobrevivência e a diferenciação celular uma vez que o seu papel é prevenir a morte neuronal durante o estresse (SCHÄBITZ *et al.*, 2007) e na plasticidade (MARTINOWICH *et al.*, 2007; MATTSON *et al.*, 2004). Este fator também promove o desenvolvimento de neurônio imaturos, e aumenta a sobrevivência dos já diferenciados (LINDSAY, 1994). Além disso, a produção de citocinas pró-inflamatórias aumenta a secreção de BDNF por monócitos *in vitro* (SCHULTE-HERBRÜGGEN *et al.*, 2005), entretanto, em modelos experimentais o BDNF pode reduzir o processo inflamatório (MAKAR *et al.*, 2008).

Recentemente, KRABE e colaboradores demonstraram que baixos níveis de BDNF relacionam com alto risco de mortalidade em idosas, independentemente da educação, morbidade e baixo-nível inflamatório, confirmando a hipótese de que níveis circulantes de BDNF são um importante *link* entre a rede de doenças e as comorbidades no envelhecimento. Níveis alterados de BDNF têm sido descritos em diversas doenças neurológicas e psiquiátricas incluindo Alzheimer (SCHINDOWSKI *et al.*, 2008; YASUTAKE *et al.*, 2006), Huntington (CIAMMOLA *et al.*, 2007), depressão (LASKE *et al.*, 2007), desordens bipolares (GAMA *et al.*, 2007) e equizofrenia (GAMA *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2008).

1.5 Sarcopenia

A sarcopenia foi definida por Matiello-Sverzut, em 2003, como a perda de massa e de força muscular relacionada à idade, não requerendo uma doença para acontecer. No entanto, esse processo pode ser acelerado em decorrência de algumas doenças crônicas, o que desencadearia o envelhecimento patológico, ou a senilidade (MATIELLO-SVERZUT,2003). O termo sarcopenia atualmente pode ser utilizado para descrever mudanças relacionadas à idade que ocorrem no sistema músculo-esquelético, englobando os efeitos de alterações de inervação nos sistemas nervoso central e periférico, alterações do estado hormonal, alterações da ingestão calórica e protéica, e aumento na produção de algumas das citocinas inflamatórias (MATIELLO-SVERZUT, 2003).

A força muscular humana é definida como a força ou torque produzido por um músculo durante uma contração voluntária máxima (MALY *et al.*, 2006). A mesma alcança seu pico entre a segunda e a terceira década, apresentando um lento ou imperceptível decréscimo até as proximidades 50 anos de idade, e então inicia seu declínio com uma taxa de aproximadamente 12% a 15 % por década, com perda mais rápida após a idade de 65 anos (MALY *et al.*, 2006). Várias evidências científicas suportam que a diminuição da força muscular predispõe os indivíduos a diversos fatores, podendo alterar também sua capacidade funcional e aumentar o risco de quedas.

1.6 Exercícios Físicos

O hábito de realizar exercícios de forma regular tem sido apontado como uma das medidas preventivas da mortalidade, das doenças cardiovasculares e do

diabetes tipo 2 (PETERSEN *et al.*, 2005). O treinamento resistido moderado resulta na capacidade aumentada em produzir IFN- γ (MUELLER *et al.*, 2001) e uma maior porcentagem de células T CD4⁺ no timo, baço e sangue após o exercício (MASTRO *et al.*, 1999). Além disso, a atividade física moderada realizada a longo prazo modula a síntese de citocinas, que são importantes reguladores da resposta imunológica, podendo desacelerar o processo de imunossenescência e promovendo conseqüente melhora na qualidade de vida de pessoas idosas. Dentro desse contexto, vários programas de exercícios foram propostos na literatura. No entanto, ainda não existe consenso em relação a um programa que seja efetivo, considerando a intensidade, a duração e a modalidade de contração e a sua associação com as citocinas inflamatórias.

A maioria dos autores é unânime em apontar os exercícios isocinéticos como os de melhor efeito (EYIGOR *et al.*, 2007). No entanto, a aplicabilidade desse recurso, devido ao seu alto custo, torna-o inviável para a realidade brasileira. Em contraposição, outra forma de tratamento com bons resultados quanto ao ganho de força muscular são os programas baseados em exercícios excêntricos por serem exercícios funcionais. É importante ressaltar que as conseqüências da diminuição da força muscular dos extensores do joelho (ação excêntrica), a perda da estabilidade articular e da ativação muscular na marcha do idoso, predispõem ao maior risco de quedas (MACIEL *et al.*, 2005; OZCAN *et al.*, 2005; McGIBBON *et al.*, 2002; SHKURATOVA *et al.*, 2004). Dessa forma, pode-se pressupor que intervenções que promovam o fortalecimento desse grupo muscular podem modificar os níveis de citocinas, assim como melhorar a velocidade de marcha, a atividade e o desempenho funcional desses idosos, diminuindo ainda o risco de quedas (PAIXÃO *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2003).

Contudo, devem ser realizados estudos, considerando a intensidade, o tipo de contração e a duração do programa em relação ao aumento de força muscular e, então, verificar as possíveis modificações em relação ao perfil de citocinas produzido. Diante disso, o presente estudo propõe estudar o efeito da intervenção cinesioterápica com exercícios resistidos com carga progressiva para membros inferiores elaborados e supervisionados pelos pesquisadores sobre a força muscular dos extensores dos joelhos de idosas pré frágeis, e a sua conseqüente associação com os parâmetros imunoregulatórios.

Objetivos

2. Objetivos do estudo

2.1. Geral:

Avaliar a população de células T regulatórias (CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3), a produção de citocinas e fatores neurotróficos em idosas com síndrome da fragilidade da comunidade antes e após um programa de intervenção fisioterápica.

2.2. Específico:

- Quantificar a população de células Tregs (CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3⁺) em idosas pré-frágeis e frágeis e verificar se essa relação modifica-se após realização de um programa de exercícios resistidos com carga progressiva para os extensores dos joelhos, em idosas pré-frágeis da comunidade.
- Quantificar a produção de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10) no sobrenadante da cultura de PBMC com e sem estímulo (anti-CD3 e anti-CD28) antes e após realização de um programa de exercícios resistidos com carga progressiva para os para extensores dos joelhos, em idosas pré frágeis da comunidade.

- Quantificar a produção de fatores neurotróficos (BDNF, GDNF e NGF) em idosas não-frágeis e pré-frágeis e verificar se essa relação modifica-se após realização de um programa de exercícios resistidos com carga progressiva para os extensores dos joelhos, em idosas pré-frágeis da comunidade.
- Analisar os parâmetros funcionais e de força muscular das idosas com síndrome da fragilidade e verificar se essa relação modifica-se após realização de um programa de exercícios resistidos com carga progressiva para os extensores dos joelhos, em idosas pré-frágeis da comunidade.

Pergunta do estudo

Será que um programa fisioterápico constituído por exercícios resistidos com carga progressiva para membros inferiores é capaz de modificar a frequência das células T regulatórias, a produção de citocinas e fatores neurotróficos?

Metodologia

3. Metodologia

3.1. Amostra

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (ETIC 008/09 de 20 de maio de 2009). Foram selecionadas 53 mulheres idosas, maiores de 65 anos, residentes da comunidade, sem restrição de raça e/ ou classe social. Todas as voluntárias foram submetidas à aplicação de um questionário estruturado para caracterização da amostra quanto aos aspectos clínico sócio demográficos (**Anexo 1**) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 2**) concordando em participar do estudo.

- **Resultados do piloto para cálculo amostral**

O cálculo amostral foi realizado a partir de um piloto com seis indivíduos utilizando os procedimentos que foram reproduzidos na coleta de dados. A partir dos dados da variável população de células T regulatórias (CD4⁺, CD25⁺ e FOXP3⁺) foi calculado o tamanho do efeito (d) e encontrado um cálculo amostral de 8 indivíduos considerando α igual a 5% e poder de 80% (PORTNEY & WATKINS).

3.2. Critérios de Inclusão

Foram incluídas no estudo idosas analisadas segundo os critérios estabelecidos por Fried *et al.*, 2001. Sendo assim, indivíduos com três ou mais

dos critérios previamente descritos positivos seriam classificados como frágeis, aqueles com um ou dois critérios como pré-frágeis e não frágeis os idosos que não apresentassem nenhum dos critérios descritos.

3.3. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão, para os dois grupos, foram indivíduos que tiverem sido submetidos a cirurgias ortopédicas dos MMII e/ ou com história de fratura; aquelas que não forem capazes de deambular sem auxílio e portadoras de doenças neurológicas. Serão excluídas também idosas que apresentarem algum tipo de doença inflamatória na fase aguda ou neoplasia em atividade nos cinco anos anteriores e que usarem medicamento com ação ampla sobre o sistema imunológico e que, apresentarem alterações cognitivas detectáveis através do Mini-Exame do Estado Mental (BERTOLUCCI *et al.*,1994).

3.4. Instrumentos e procedimentos

§ Dados Clínicos sócio-demográficos

Para caracterização da amostra, os dados sócio-demográfico e as informações relativas às condições clínicas dos idosos (como hábitos saúde, medicações utilizadas, presença de comorbidades, ocorrência de quedas, déficits visuais e auditivos, auto-percepção da saúde, dentre outras informações) foram obtidos por meio de um questionário estruturado aplicado por examinadores treinados (**Anexo 1**).

- **Massa Corporal**

A massa corporal e a altura foram verificadas por meio de uma balança calibrada (Asimed®; Barcelona, Espanha). A partir destes dados foi calculado o IMC (Kg/ m²) de cada participante (NORTON *et al.*, 2005).

§ **Nível de Atividade Física**

O nível de atividade física dos idosos foi avaliado por meio da aplicação da versão brasileira do questionário *Minnesota Leisure Time Activities Questionnaire* (**Anexo1**) (TAYLOR *et al.*, 1978), em processo de tradução e adaptação. É um questionário largamente usado em pesquisas de atividade física, que avalia o dispêndio de energia (kilocalorias), baseado no auto-relato das atividades e exercícios físicos realizados nos últimos 12 meses, ajustado segundo o sexo. O coeficiente de correlação teste-reteste foi de 0,92 (RICHARDSON *et al.*, 1994).

- **Força muscular de preensão manual e dos extensores do joelho**

Dinamômetro de Jamar

A força muscular de preensão manual foi mensurada por meio do dinamômetro de JAMAR®, modelo PC5030JI, aceito como um instrumento padrão para mensuração da força de preensão (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Os valores relatados na literatura para a confiabilidade teste-reteste ($r \geq 0,80$) e inter-examinadores ($r \geq 0,97$) do teste de força de preensão manual, utilizando o

dinamômetro de JAMAR[®], demonstraram alta confiabilidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A medida da força muscular de preensão manual foi realizada por avaliadores previamente treinados a utilizar o instrumento. As participantes foram posicionadas assentadas em cadeira sem braços, e orientadas a manter os pés totalmente apoiados no chão, quadris e joelhos flexionados a 90 graus, ombros aduzidos e em posição neutra para rotação, o cotovelo em 90º de flexão e antebraço e punho em posição neutra. Para mensurar a força de preensão manual foi solicitado às participantes a realização de três manobras de preensão máxima, sempre com um minuto de descanso entre uma preensão e outra. O dinamômetro foi ajustado no espaço 2º ou 3º conforme o mais confortável para a participante. Os resultados das medidas são apresentados em Kilograma/força (Kgf).

Dinamômetro isocinético

Para avaliar a força muscular dos grupos musculares quadríceps e isquiossurais foi utilizado o dinamômetro isocinético da marca *Biodex System 3 Pro* (Byodex Medical System, Shirley, NY, USA). Trata-se de um aparelho eletromecânico controlado por um microcomputador que avalia quantitativa e objetivamente parâmetros físicos de função muscular, como força, potência e resistência em diferentes articulações e em diversas velocidades angulares (PERRIN *et al.*, 1993). O conceito de movimento isocinético foi desenvolvido por James Perrine, foi introduzido na literatura científica por Hislop e Perrine (1967) e testada validade e confiabilidade por Thistle, Hislop, Moffroid e Lohman, também em 1967. Um dispositivo isocinético permite que o indivíduo exerça a força e

movimento angular máximo possível, em uma velocidade pré determinada. Ou seja, tem como característica a manutenção da velocidade constante durante todo o arco de movimento, permitindo que o músculo exerça sua capacidade máxima em toda a amplitude (PERRIN *et al.*, 1993).

A força muscular dos extensores de joelho foi na velocidade angular de 60 graus/ segundo. Para avaliação da força muscular do quadríceps e dos isquiossurais, as participantes foram posicionadas sentadas na cadeira do dinamômetro, com tronco, pelve e coxa estabilizados por cintos e as pernas pendentes. A distância utilizada entre a borda da cadeira e a fossa poplítea das participantes foi de aproximadamente de cinco centímetros. O encosto da cadeira foi posicionado em 85°, e o eixo rotacional do aparelho foi alinhado com o eixo rotacional da articulação do joelho, na altura do côndilo lateral do fêmur. O braço de alavanca foi posicionado paralelamente à perna, com almofada de apoio fixada no terço distal anterior da mesma, imediatamente acima do maléolo lateral. A amplitude de movimento para realização do teste foi de 90°, partindo do ângulo de 90° de flexão do joelho até 0° de extensão do joelho.

As participantes foram inicialmente submetidas à familiarização com o instrumento, realizando três repetições com força sub-máxima para tomar conhecimento e entender o funcionamento do teste antes da avaliação realizada em 60°/s. Antes da realização de cada protocolo, foi medido o torque produzido pelo peso do MI, para correção do efeito da gravidade sobre a musculatura envolvida, conforme instruções do fabricante.

O teste isocinético foi realizado bilateralmente e conforme preconizado pelo fabricante, iniciado pelo membro dominante. A perna dominante foi definida como aquela que seria usada para chutar uma bola. As idosas foram submetidas ao

protocolo para avaliação da força muscular dos MMII e cada participante realizou cinco repetições na velocidade 60º/s.

- **Timed Up and Go**

Para avaliação da mobilidade foi utilizado O *Timed Up and Go Test* (PODSIADLO *et al.*, 1991; TINETTI *et al.*, 2003; BOHANNON *et al.*, 2006). O teste consiste em avaliar o desempenho e o tempo para o indivíduo realizar a tarefa na qual ele é solicitado a levantar-se, a partir da posição sentada em uma cadeira padronizada com 44 a 47 cm de altura do assento, sem braços, deambular três metros, girar, retornar para a cadeira e sentar-se novamente. Estudos observaram que adultos sem alterações no equilíbrio, realizam o teste em 10 segundos ou menos; com independência, em transferências básicas, em 20 segundos ou menos e aqueles dependentes, em AVDs e mobilidade, mais de 30 segundos para realizar o teste (32). O tempo (segundos) gasto para completar a tarefa é relacionado ao nível de mobilidade funcional e a idade(32). Apresenta alta confiabilidade intraexaminadores (ICC = 0,99) e interexaminadores (ICC = 0,99) (32;33). Estudos de validade de critério compararam o TUG e a escala de Berg demonstrando um CCI = 0,99 e consistência interna $\alpha = 0,96$ (33).

- **Escala de Depressão Geriátrica**

A presença de sintomas depressivos foi avaliada pela versão reduzida Escala de Depressão Geriátrica (EDG) (**Anexo 1**). Ela é um dos instrumentos mais freqüentemente utilizados para o rastreamento de depressão em idosos.

Nesse estudo foi utilizada versão curta da escala original. Essa versão, composta por 15 itens, foi elaborada a partir dos itens que mais fortemente se correlacionavam com o diagnóstico de depressão. Consiste de um questionário com 15 questões dicotômicas (Sim x Não), referentes a mudanças no humor e a alguns sentimentos específicos como sensação de desamparo, inutilidade, desinteresse, aborrecimento, felicidade, entre outros. O ponto de corte para identificação de sintoma depressivo é o escore acima de 5 pontos. Esses itens, em conjunto, mostraram boa acurácia diagnóstica, com sensibilidade (81%), especificidade (71%), e consistência interna ($\alpha=0,75$) adequadas.

- **Mini-Exame do Estado Mental**

Para avaliar o desempenho cognitivo dos idosos foi aplicada a versão adaptada para a população brasileira do Mini-Exame do Estado Mental (MEEM), **(Anexo 1)** considerando os pontos de corte de 13 para analfabetos, 18 para indivíduos com 1 a 7 anos de escolaridade e 26 para aqueles com 8 ou mais anos de escolaridade (FOLSTEIN *et al.*, 1975; BERTOLUCCI *et al.*, 1994).

O Mine Exame do Estado Mental fornece informações sobre a capacidade de concentração, memória, atenção, orientação temporoespacial, capacidade de cálculo e evocação e linguagem. Este instrumento foi validado para a população brasileira por Bertoluci em 1994.

§ **Exercícios físicos**

As idosas foram submetidas a um programa de atividade física. O programa de treinamento teve uma duração de dez semanas, totalizando trinta sessões, realizadas três vezes por semana, em grupo de no máximo oito idosas, em um ginásio terapêutico.

O programa constou de exercícios de membros inferiores (**Anexo 3**), os grupos musculares treinados foram: extensores e flexores de joelho, extensores, flexores, adutores e abdutores de quadril, nas contrações concêntricas e excêntricas, com resistência progressiva (uso de caneleiras), orientados e acompanhados por uma equipe de pesquisadores previamente treinados. A carga adequada a cada participante foi definida por meio do cálculo de resistência máxima (RM).

Para cálculo da RM para extensores do joelho foram realizados os seguintes procedimentos: Paciente assentada na maca, pés apoiados em uma cadeira, mãos apoiadas no colchão, atrás do quadril e joelho a 90° de flexão.

Colocamos a caneleira de 1 / 2 kgs e em seguida pedimos que realizasse a extensão de joelho. Se relatar estar muito fácil aumentar de 2 / 2 kgs. Se relatar dificuldade aumentar 1 kg. Dar intervalo de 3 a 5 minutos entre cada uma das tentativas. Realizar no máximo 5 tentativas por dia.

Os participantes iniciaram os exercícios com 50% da RM; após duas semanas (7ª sessão) a carga foi reajustada para 75% da RM. Na 13ª e 22ª sessões a RM foi recalculada, sendo os exercícios realizados com 75% da nova RM. Após um período de dez semanas, as idosas de ambos os grupos foram reavaliadas.

3.5. Imunofenotipagem das células Treg

As células Treg (com fenótipo CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) foram obtidas a partir do sangue periférico das pacientes. Desta forma, 10 ml do sangue venoso periférico foi recolhido em tubos Vacutainer® contendo heparina sódica e centrifugados sobre gradiente de Ficoll (Ficoll- Paque™Plus, GE Healthcare Bio-Science AB). O anel de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) formado foi recolhido, as células foram contadas em câmara de Neubauer® utilizando o corante intravital azul de Tripan. As células foram ressuspensas e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1mg/mL), 1mM L-glutamina e 10% de soro humano inativado AB Rh⁺, a uma concentração final de 1,0x10⁷ células/ml.

Em seguida, as células foram plaqueadas em placa de fundo em “U” de 96 wells, na concentração final de 2,5x10⁶ células/well, em meio RPMI completo nas condições de estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28), ou sem estímulo (meio). As células foram mantidas em cultura por 16 horas em estufa de CO² a 37°C. As PBMC de pacientes idosas frágeis foram incubadas na presença de anticorpos monoclonais (mAb) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ou Cychrome (Cy) por 20 minutos a 4° C.

Após marcação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 0,1% de azida sódica, fixadas com 200 µL de PBS com 2 % formaldeído e mantidas a 4°C até a aquisição em citômetro de fluxo (FACScan – BECTON DICKINSON, USA). Os mAbs foram utilizados para a marcação dos controles de isotipo conjugados com FITC (FL-1), PE (FL-2) e Cy (FL-3) e anti-CD4, anti-CD25 e anti-Foxp3

conjugados com FITC, PE ou Cy. O mAB anti-Foxp3 foi marcado seguindo o protocolo de marcação intracelular (descrito abaixo), uma vez que é um fator de transcrição celular. Por esse mesmo motivo, não é necessário a adição de 1 $\mu\text{g/ml}$ de brefeldina A para esse anticorpo.

A viabilidade celular e pureza das subpopulações obtidas foram confirmadas por citometria de fluxo.

Foi realizada a avaliação do perfil celular da amostra, com relação ao tamanho e a granulosidade das células. Para a aquisição, armazenamento e análise dos dados referentes à resposta celular foi empregado um citômetro de fluxo, equipado com sistema de computador contendo o software CellQuest®.

As populações de linfócitos foram selecionadas em gráficos de tamanho versus granulosidade. A identificação da população celular de interesse foi confirmada através dos gráficos de intensidades de fluorescências.

A seqüência de procedimentos adotados para a análise dos dados obtidos por citometria de fluxo está representada na figura 1. Inicialmente, seleciona-se a população de interesse, no caso desse estudo, os linfócitos. Os linfócitos apresentam tamanho (FSC - Forward Scatter) entre 200 - 400 μm e granulosidade (SSC - Side Scatter) inferior a 200 μm . Gráfico dot plot de FSC e SSC são construídos e os linfócitos identificados são selecionados em regiões R1. A partir dessa seleção, analisamos a intensidade de fluorescência dos marcadores de interesse ligados aos anticorpos conjugados. Gráficos de distribuição puntual de fluorescência e seleção da região de interesse - R2 e R3 foram construídos. A intensidade dos fluorocromos foi medida a partir dos diferentes comprimentos de ondas emitidos pela excitação dos mesmos e captados pelos três tipos de canais fotomultiplicadores presentes no citômetro (FL1, FL2 e FL3). A frequência em

percentual das células com o fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ foi confirmada em gráficos de histograma com seleção da região M1.

Os procedimentos de análise foram realizados no Laboratório de Imunofarmacologia do Departamento de Bioquímica, do ICB, da UFMG.

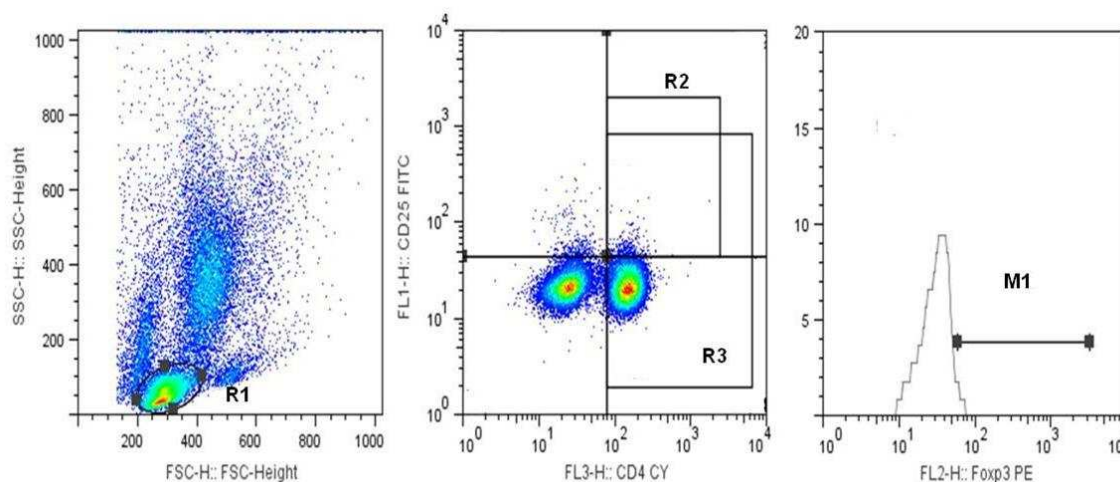


Figura 1. Gráficos dot plot e histograma ilustrativos utilizados em uma análise de citometria de fluxo para a população de células T reguladoras ($CD4^+$, $CD25^+$ e $FOXP3^+$) antes e após a intervenção fisioterápica.

3.6. Medidas de $TNF-\alpha$, IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10

Dez ml do sangue venoso periférico foram recolhidos em tubos Vacutainer® contendo heparina sódica e centrifugados sobre gradiente de Ficoll (Ficoll- Paque™Plus, GE Healthcare Bio-Science AB). O anel de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) formado foi recolhido, as células foram contadas em câmara de Neubauer® utilizando o corante intravital azul de Tripán. As células foram ressuspensas e mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1mg/mL),

1mM L-glutamina e 10% de soro humano inativado AB Rh⁺, a uma concentração final de $1,0 \times 10^7$ células/ml.

Em seguida, as células foram plaqueadas em placa de fundo em “U” de 96 wells, na concentração final de $2,5 \times 10^6$ células/well, em meio RPMI completo nas condições de estímulo policlonal (anti-CD3 e anti-CD28), ou sem estímulo (meio). As células foram mantidas em cultura por 16 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida o sobrenadante da cultura foi recolhido e estocado em freezer a -20°C. A análise das concentrações plasmáticas de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10 (DuoSet, R&D Systems, MN USA) foi realizada através do método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). As leituras foram feitas por um leitor de microplacas ajustado para 490nm e correção do comprimento de onda a 650nm. O processo de análise foi realizado no Laboratório de Inflamação e Dor em Reabilitação do Departamento de Fisioterapia da UFMG.

3.7. Medidas de BDNF, GDNF e NGF

Para mensuração dos níveis plasmáticos de BDNF, GDNF e NGF foram colhidos 5 ml de sangue da veia ulnar dos participantes em vacutainers com citrato em ambiente estéril. O procedimento foi realizado por profissional qualificado. Após a coleta, os tubos vacutainers, foram levados em um suporte para centrifugação em 1500 rpm em Fanem, por 15 minutos. Posteriormente, o plasma foi retirado em capela de fluxo laminar, utilizando pipetas de Pasteur previamente siliconizadas, colocado em Eppendorfs estéreis e estocado em

freezer a -20°C . A análise das concentrações plasmáticas de BDNF, GDNF e NGF (DuoSet, R&D Systems, MN USA) foi realizada através do método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). As leituras foram feitas por um leitor de microplacas ajustado para 490nm e correção do comprimento de onda a 650nm. O processo de análise foi realizado no Laboratório de Inflamação e Dor em Reabilitação do Departamento de Fisioterapia da UFMG.

3.8. Análise estatística

A análise estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (amplitude e desvio padrão), para a caracterização da amostra. A normalidade da distribuição dos dados foi analisada utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Levando em consideração a distribuição normal das variáveis, diferenças entre um grupo antes e após a intervenção foram avaliadas através da utilização do teste t pareado, enquanto diferenças entre grupos com diferentes categorias da síndrome da fragilidade foram avaliadas utilizando teste t não-pareado. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Artigo 1

Physical Therapy intervention increases T regulatory cells frequency in Pre-Frail elderly women.

**Coelho FM¹, Pereira DS¹; Vieira, ELM²; Fagundes, CT²; Lustosa LP¹; Silva JP¹;
Dutra WO³; Teixeira MM²; Pereira LSM¹.**

1- Departamento de Fisioterapia da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. 2- Departamento de Bioquímica e Imunologia, 3- Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Abstract

Background: Immunosenescence influences many components of the immune system. Most importantly, profound changes in T cell function are evident in older individuals. **Objective:** we investigated differences on Treg cells frequency according to frailty phenotype and the impact of a physical intervention over these cells and inflammatory cytokine production. **Methods:** A convenience sample of 20 pre-frail and 5 frail elderly women was selected and criterion for the frailty phenotype was assessed. The physical therapy intervention group was composed by 8 pre-frail elderly women selected from this group. Flow cytometry methods were used for examination of Treg cells (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). Cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ and IL-10) were measured on the supernatant of PBMC culture through sandwich ELISA. Also, clinical parameters were analyzed, such as TUG, Hand grip and Work/body weight before and after intervention. **Results:** The frail elderly women had a decrease in the number of Treg cells in comparison with pre-frail. The physical therapy protocol increased strength and gait speed of pre-frail elderly women. This intervention also increases the number of Treg cells in pre-frail elderly women. Levels of pro-inflammatory cytokines on the supernatant of PBMC in culture did not increase after stimulus in the same manner before and after intervention on the supernatant of PBMC in culture. **Conclusions:** The present study shows that a progressive dynamic resistance-training program may modulate the Treg cells frequency and synthesis of certain cytokines, which are important regulators of the immune response, and may ameliorate status of the immune system in senescence.

1. Introduction

Frailty is an important geriatric syndrome characterized by poorer physiological reserve and greater vulnerability to severe adverse outcomes, including disability, dependency, and early mortality^{1, 2}. Significant evidence suggests that chronic inflammation contribute to frailty directly or through other intermediary processes³⁻⁵, but potential underlying immune mechanisms that contribute to frailty and its associated chronic inflammation in older adults have not been elucidated.

In this context, alterations in the immune system that occur with aging likely contribute to increased risk of infection and malignancy in the elderly^{6, 7}. The increased frequency of infection and tumors in the elderly suggests the possibility of reduced inflammatory response with aging. However, aging appears to be associated with dysregulated inflammation as suggested by increased plasma levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α that predict an increased mortality risk independently of other risk factors in the elderly^{8, 9}. Thus, it is largely unknown about the mechanisms underlying dysregulated inflammation with aging in humans.

A population of naturally occurring CD4⁺, CD25⁺ T cells with immune regulatory functions exists in humans and mice¹⁰. Recently, studies demonstrate that the forkhead family transcriptional factor FOXP3 is expressed in CD4⁺, CD25⁺ T regulatory (Treg) cells and that transfection of the same molecule to CD4⁺CD25⁻ T cells, which do not have regulatory function, confers the immune regulatory property¹¹. Concomitant with reduced thymic production of non-regulatory T cells during aging, it is conceivable that thymic Treg output decreases with age. Therefore, alternative pathways like peripheral generation of Treg may have to compensate for thymic failure and to maintain a sufficient large peripheral Treg pool^{12, 13}.

Physical inactivity accelerates the development of major noncommunicable diseases, with studies showing a particularly marked and consistent effect on cardiovascular diseases¹⁴. Several studies have demonstrated a strong and consistent inverse relationship between physical fitness and leukocyte count and markers of inflammation such as serum IL-6 and serum CRP¹⁵⁻¹⁷, whereas

serum IL-10 is positively related to fitness¹⁸. However, there is no consensus that physical exercises interferes in Treg cells counts or their activity.

In the current study, we investigated differences on Treg cells frequency according to frailty phenotype and the impact of a physical intervention over these cells and inflammatory cytokine production.

2. Material and methods

This is a quasi-experimental study that includes women from the general community of the city of Belo Horizonte, Brazil. The project was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais n° ETIC 008/09.

2.1. Sample

A convenience sample of 20 pre-frail and 5 frail elderly women was selected and criterion for the frailty phenotype was assessed. The physical therapy intervention group was composed by 8 pre-frail elderly women selected from this group. As the feminization of the elderly population leads to a greater prevalence of chronic illnesses and disability¹⁹, only women were included so as to avoid a gender bias regarding muscle strength and the health status of the sample. The exclusion criteria were: acute inflammatory condition or active neoplasm in the previous five years; use of medication with broad-based action on the immune system; amputation or fracture of the upper or lower limbs in the previous six months; presence of any neurological diseases; and cognitive alterations detected by the Mini-Mental Status Examination^{20, 21}.

2.2. MMSE

The Mini-Mental Status Examination (MMSE) adapted for the Brazilian population was used to assess cognitive performance, considering cutoff points of 13 for illiterate individuals, 18 for those with 1 to 7 years of schooling and 26 for those with 8 or more years of schooling^{20, 21}.

2.3. Frailty Phenotype

The weight loss variable in the phenotype proposed by Fried et al.¹ was collected by means of the following question: “Have you lost more than 4.5 Kg in the last year unintentionally (that is, without diet or exercise)?”. The exhaustion criterion for the frailty phenotype was assessed through two items on the CES-D questionnaire: Item 7 (“I felt that everything I did was an effort”) and Item 20 (“I could not get “going”). Both items should be answered considering the week prior to the administration of the questionnaire. Energy expenditure was measured using the Minnesota Leisure Time Activity Questionnaire. Grip strength – another phenotype criterion was measured using a JAMAR dynamometer (model PC5030JI), with the positioning of the volunteer following the recommendations of the American Society of Hand Therapists and considering the mean of three measurements²². Slowness was assessed by the time (in seconds) spent walking a distance of 4.6 metros. All criteria adopted the classification cutoff points for frail and non-frail individuals proposed by Fried et al.¹. Those with three or more of these criteria were considered frail; individuals with one or two of the criteria were considered pre-frail; and individuals with none of these criteria were considered non-frail¹.

2.4. Measurement of muscle strength

A Biodex Systems 3 Pro (Biodex Medical Systems, Shirley, NY, USA) isokinetic dynamometer was used to assess the muscle strength of the quadriceps and hamstrings groups. This instrument has been accepted as the “gold standard” for assessment of muscular performance²³. The entire procedure was done according to the manufacturer’s instructions. A 10 minute walk was completed, as an MMII muscle warm-up, prior to the assessment on the isokinetic dynamometer.

Muscle performance was assessed on the dominant leg at angular speeds of 60°/s in concentric contractions, with five and fifteen repetitions respectively, at intervals of 30 seconds between each velocity. Participants initially familiarized themselves with the instrument by practicing an average of three times at sub-maximum force. The torque produced by the leg was

then measured to correct for the effect of gravity. These results are presented in Newtons/meter (Nm) for peak torque and percentage in work per body weight for dominant knee movements.

2.5. Intervention

The training group conducted a 10-week progressive dynamic resistance-training program of knee extensors and flexors, three times per week. Each session lasted 60 min and began with a 5-10 min warm-up followed by straining exercises for muscles of the lower extremities. Next, the maximal resistance (RM) was established in order to assess the correct relative training load for each subject. During the first 2 weeks, the training load was set at 50% of the amount of weight that could be lifted once (1RM). From weeks 2 to 10, each session consisted of three sets of eight repetitions with a load equivalent to 75% of the 1RM. 1RM was tested on 5 and 8 weeks and the resistance adjusted to maintain a progressive training stimulus²⁴. All training sessions were surveyed and supervised by a physiotherapist.

2.6. TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-10 measurement

Ten millimeters (ml) of blood were collected from the ulna vein of the participants in Vacutainers with citrate by a qualified healthcare professional, complying with the norms for the use of sharp instruments in an aseptic environment. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (Ficoll- PaqueTMPlus, GE Healthcare Bio-Science AB) centrifugation. Cells were resuspended in RPMI and cell viability was checked by trypan-blue exclusion. Cells were incubated for 16 hours in a 96-well round bottom tissue culture plate with or without anti-CD3 and anti-CD28 Abs (at 1mg/ml final concentration). Then, supernatant of PBMC culture were collected and measured according to the procedures supplied by the manufacturer performed through sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits for TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ and IL-10 (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

The results are presented in picograms per ml (pg/mL). Readings were performed by a single microplate reader adjusted to 490nm and wave length correction at 650nm at the Immunopharmacology Laboratory of the Biological Sciences Institute of the University.

2.7. Cell surface and single-cell intracellular cytokine staining

The Treg cells (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) obtained from PBMC were cultured in 96-well plates in 200 μ l for 16 hours with or without stimulus. Brefeldin-A (at 1 μ g/ml), was added during the last 4 hours of culture. The cells were stained with a combination of fluoresceine isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or cy-chrome (Cy)-labeled antibodies directed against surface molecules (CD4, CD25 and Foxp3), intracellular molecules (IFN- γ) and isotype controls, and data acquired using a FACScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA). The raw data of FACS analysis was processed using the Cell Quest software (Becton Dickinson, San José, CA, USA). Collected flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

2.8. Statistical Analysis

All variables were tested for normality of distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Differences between two groups were evaluated using the Paired t-test. Differences between more than two groups were evaluated using the One-way ANOVA. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences, SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

Table 1 displays the clinical and demographic characteristics of the elderly women, such as age, body mass index (BMI), number of chronic illnesses, education (years), MMSE, hand grip (Kgf) and GDS in both groups, pre-frail and frail. There is no statistical difference between both groups regarding the parameters evaluated in the present study.

First, experiments were conducted to evaluate the difference on total CD4⁺ cells (**A**) and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ cells (**B**) in subgroups according to frailty phenotype: pre-frail and frail elderly women (**Figure 1**). Statistical differences were found between pre-frail and frail, suggesting that frail phenotype induces a decrease in the number of Treg cells.

Next results demonstrate that this intervention increased the number of Treg cells (**B**) in pre-frail elderly women, to levels similar to that found in non-frail. However, the physical therapy protocol had any impact over CD4⁺ total cells (**A**) in pre-frail elderly women (**Figure 2**).

Then, to assess the functional impact of the physical therapy protocol, we observed the clinical parameters, such as TUG, hand grip, peak torque and work per body weight (**Table 2**). This table shows difference in TUG after the physical protocol, demonstrating the efficacy of the intervention in improving functional parameters as gait speed in elderly women. However, the hand grip and work per body weight did not change.

Then to access whether the intervention would induce any change in the profile of cytokine production after lymphocyte stimulation, PBMC obtained from the subjects were put in culture and, after stimulation with anti-CD3 and anti-CD28, the concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-6 (**A**), TNF- α (**B**), IL-1 β (**C**) and IFN- γ (**D**) (**Figure 3**) and of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (**Figure 4**) on the supernatant were measured. Before physical therapy protocol, stimulus of PBMC increased the production of TNF- α in 28.4%, IL-6 in 64.9%, IL-1 β in 55.6% and IFN- γ in 42.4% while after the protocol none of this cytokines had a significant increase. On the other hand IL-10 did not increase with stimulus before the physical protocol and increased 86.69% when received the stimulus after the protocol. Looking at the

results we can suggest that after a period of 10 weeks of physical exercises elderly subjects react differently in front of a stimulus with a higher production of IL-10 and decrease of TNF- α , IL-6, IL-1 β and IFN- γ . In addition, IL-6 was the only cytokine analyzed in the present study that showed an increased in basal level after physical therapy protocol.

4. Discussion

Frailty can be generally defined as a physiologic state of increased vulnerability to stressors that results from decreased physiologic reserves, and even dysregulation, of multiple physiologic systems. This decreased reserve results in difficulty in maintaining homeostasis in the face of perturbations^{1, 25-28}, whether they are extremes of environmental temperature, exacerbations of a chronic disease, an acute illness, or an injury. There are numerous systems in which such physiologic decrements in mass or function have been demonstrated with age, including neuromuscular, such as sarcopenia and decrease in muscle fiber function; osteopenia; dysregulation of the hypothalamic axis, of heart rate variability and even of inflammation and of immune function^{26, 28}. In the present study, It was observed that pre-frail and frail older adults had decreased Treg cells count in comparison with non-frail, reinforcing the hypothesis that frailty syndrome is directly related to immune dysfunction. Different studies have also demonstrated that during aging process, sub clinical chronic inflammation has an impact over sarcopenia and functional abilities of elderly²⁹.

Alterations in the immune system that occur with aging likely contribute to the development of inflammatory diseases in the elderly. Recently, a study known as the SENIEUR protocol showed that senescence is not necessarily associated with deterioration of immune function but rather with remodeling of it³⁰. Although the exact causes for such alterations are not determined, changes in mechanisms of regulation of the inflammatory responses may account in part for developing such conditions with aging. Upon exposure to antigens, innate immune cells are activated (macrophages, neutrophils, and natural killer cells) releasing cytokines and chemokines that recruit additional cells to the site of antigen encounter, a process commonly referred as inflammation. This innate immune response can further progress to an adaptive (antigen-specific) immune response with the recruitment of effector T and B lymphocytes. Following effective clearance of the antigen, the inflammatory immune response should be down regulated to prevent inadvertent damage. This latter process is in part mediated by a specialized

subset of T cells called regulatory T cells¹⁰. CD4⁺ T cells that express high levels of CD25 and FOXP3 have been recognized as naturally occurring Treg that have a critical role in regulating inflammatory immune responses. We have found that the frequency of this regulatory population was altered during frailty syndrome, supporting the concept that alteration in mechanisms of inflammatory responses regulation may account for development of inflammatory diseases during aging.

CD25 was used as a single marker for CD4⁺ Treg in most studies investigating the effect of aging on human CD4⁺ Treg cells³¹, although this molecule can also be up-regulated on activated T cells. In our study, we used CD25 and FOXP3 which is considered as an essential and sufficient marker to identify CD4⁺ Treg cells¹¹. Hwang et al.³² found that the frequency and phenotypic characteristics of CD4⁺, FOXP3⁺ T cells, as well as their capacity to suppress inflammatory cytokine production and proliferation of target cells was comparable in young and elderly individuals. However, they also showed that CD4⁺, FOXP3⁺ Treg cells of elderly people presented increased capacity of inhibiting IL-10 production by CD4⁺, CD25⁻ T cells, when compared with CD4⁺, FOXP3⁺ Treg, cells of young people. Despite the different pattern of IL-10 suppression, these findings suggest that regulatory characteristics of CD4⁺, FOXP3⁺ T cells remain unchanged with aging. However, there is no evidence that frailty syndrome is associated with alteration in Treg function. In the present study, we found that there is reduction in Treg cells frequency in frail elderly individuals. The physical therapy protocol was able to increase the Treg frequency in pre-frail individuals. Interestingly, the increase in Treg cell frequency after the physical intervention was associated with alteration in lymphocyte response after stimulation, characterized by reduced production of pro-inflammatory cytokines. These data suggest that the alteration in cell frequency induced by physical therapy was associated with changes in cellular responses. Finally, the data also support the idea that the physical intervention can interfere in immune function during frailty syndrome.

While definitions of frailty syndrome vary, most experts agree that this syndrome is characterized by a reduced functional reserve and impaired adaptive capacity resulting from

cumulative decline of multiple subsystems, including strength and muscle mass, flexibility, balance, coordination and cardiovascular functions. The presence of frailty syndrome is a predictor for hospitalization, disability, decreasing mobility, falls and even death³³. Also, frailty is associated with poor quality of life, increased health care and consequently health costs³⁴. Thus, non-pharmacologic interventions that could directly prevent, delay, and/or ameliorate frailty progression are necessary³⁵. Among interventions with the potential to benefit frail elders physical exercises are one of the most promising because of the low risk and ease of participation. However, there is no consensus about the best physical exercise protocol, in terms of frequency, intensity, training time and type of contraction. Poor evidences about the effect of a physical intervention over aspects of immunosenescence in frail community-living elderly make hard to discuss about the efficacy of the therapeutic proposal in this complex syndrome³⁶. Overall, this protocol was able to increase important functional variables as gait speed evaluated with TUG test in pre-frail elderly and also peak of torque. These data indicate gain in muscle strength, importantly to decrease the sarcopenia associated with aging process. In addition, the protocol used in the present study was able to alter the Leukocyte frequency and the pattern of lymphocyte response during stimulation.

It has been proposed that regular physical activity is anti-inflammatory partly because of the increase in serum IL-6 concentration, which may be anti-inflammatory through the increased production of IL-1 receptor antagonist and IL-10^{37, 38}. Here we demonstrate that, in addition to changes in Treg cells frequency, physical activity was able to alter the profile of pro-inflammatory cytokine production during lymphocyte stimulation. This effect was concomitant to enhancement of IL-10 production after stimulation. These data strengthen the concept that, even during aging process, physical exercises can lead to anti-inflammatory effects. However, the long term clinical effects are yet to be determined and more studies are necessary to confirm if the anti-inflammatory effect induced by physical exercise have any impact over the frailty syndrome.

In summary, the present study demonstrate the importance of progressive dynamic resistance-training program, with low costs, that may modulate Treg lymphocyte population and the synthesis of certain cytokines, which are important regulators of immune responses, and may

ameliorate status of the immune system in senescence. This amelioration may have an impact over sarcopenia and in an enhancement of quality of life of older people.

Legends

Figure 1. Comparison between CD4⁺ total cells (A) and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (B) in subgroups according to frailty phenotype. Purified peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pre-frail and frail individuals were stained with Abs to CD4 and CD25, followed by permeabilization and staining with Abs to FOXP3 or isotype Abs. Representative dot plots showing lymphocyte gate, CD4⁺T cell subsets expressing CD25⁺ and histograms demonstrating the FOXP3 expression. The *p* value refers to comparison between groups using ANOVA. The bar represents median value. **p*<0.001.

Figure 2. Comparison between CD4⁺ total cells (A) and CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (B) in pre-frail before (n=8) and after (n=8) a Physical Therapy protocol. The *p* value refers to comparison between groups using Wilcoxon test. The bar represents median value. **p*<0.001.

Figure 3. Comparison between IL-6 (A), TNF- α (B), IL-1 β (C) and IFN- γ (D) levels on the supernatant of PBMC in culture with and without stimulus (anti-CD3/anti-CD28) in pre-frail group before and after a Physical Therapy protocol. The *p* value refers to comparison between groups using Wilcoxon test. The bar represents median value. **p*<0.001.

Figure 4. Comparison between IL-10 (A) levels on the supernatant of PBMC in culture with and without stimulus (anti-CD3/anti-CD28) in pre-frail group before and after a Physical Therapy protocol. The *p* value refers to comparison between groups using Wilcoxon test. The bar represents median value. **p*<0.001.

Figure 1.

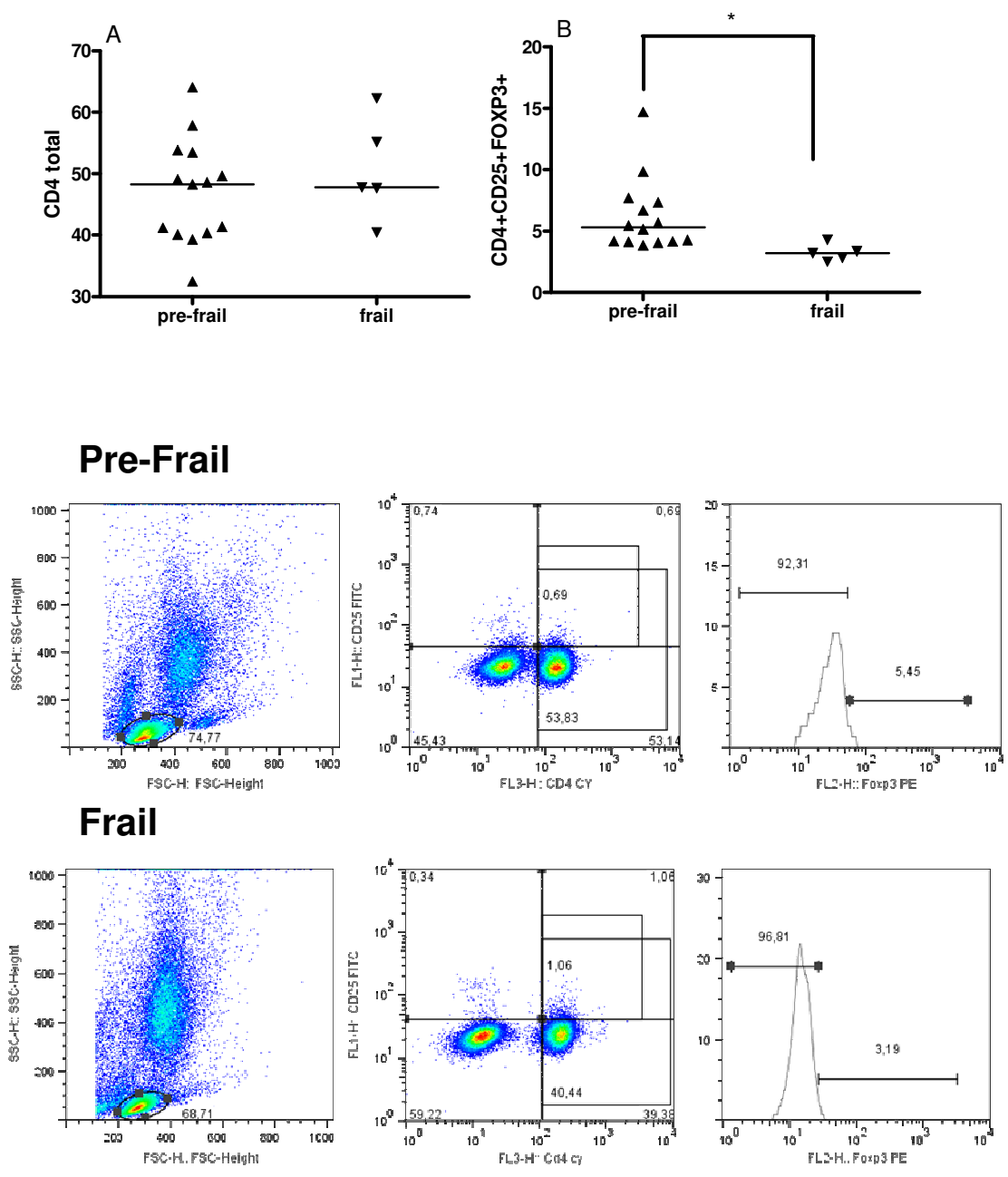


Figura 2.

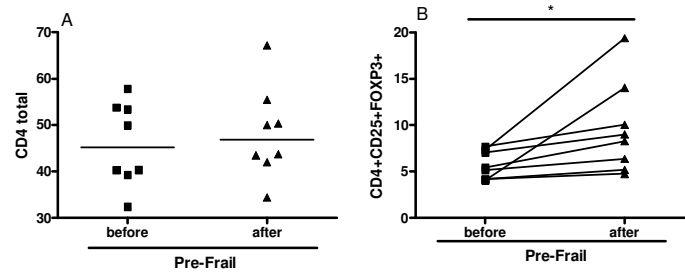


Figure 3.

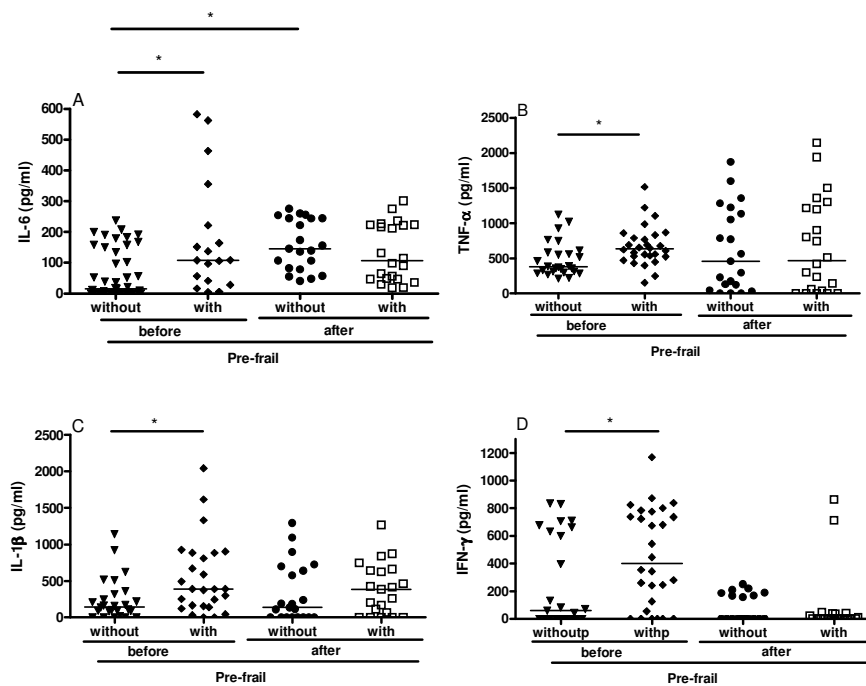


Figure 4.

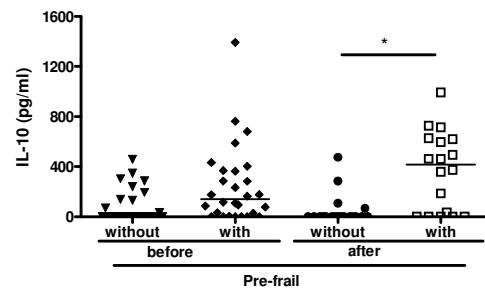


Table 1 displays the clinical and demographic characteristics of the elderly women, such as age, body mass index (BMI), number of chronic illnesses, education (years), MMSE, hand grip (Kgf).

Variables	Pre-Frail (n=15)	Frail (n=5)
Age	71.2 ± 4.5	73.4 ± 6.0
BMI (kg/m²)	30.1 ± 5.8	29.4 ± 3.8
Number of chronic illnesses	3.4 ± 1.3	2.0 ± 1.0
Education (years)	3.4 ± 1.9	4.8 ± 3.9
MMSE	23.1 ± 4.6	23.4 ± 4.8
Hand Grip (Kgf)	20.5 ± 6.3	19.3 ± 3.4

BMI= Body mass index; **MMSE**= Mini-Mental Status Examination

Table 2 Then, we observed the clinical parameters, such as TUG, hand grip, peak torque and work per body weight before and after intervention (**Table 2**).

Variables	Physical Therapy Intervention		
	Pre	Post	Paired T test
	Mean ± SD	Mean ± SD	P value
TUG (second)	12.0 ± 2.7	11.6 ± 2.3	0.011
Hand Grip (Kgf)	20.7 ± 5.8	22.5 ± 3.6	0.217
Peak Torque (Nm)	57.7 ± 20.3	73.0 ± 11.9	0.142
Work/body Weight 60°/s (%)	94.5 ± 20.5	102.1 ± 17.7	0.263

TUG= Timed Up and Go

Reference List

- (1) Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):M146-M156.
- (2) Fried LP, Hadley EC, Walston JD, Newman AB, Guralnik JM, Studenski S et al. From bedside to bench: research agenda for frailty. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005;2005(31):e24.
- (3) Leng SX, Yang H, Walston JD. Decreased cell proliferation and altered cytokine production in frail older adults. *Aging Clin Exp Res*. 2004;16(3):249-252.
- (4) Leng SX, Xue QL, Tian J, Walston JD, Fried LP. Inflammation and frailty in older women. *J Am Geriatr Soc*. 2007;55(6):864-871.
- (5) Leng S, Chaves P, Koenig K, Walston J. Serum interleukin-6 and hemoglobin as physiological correlates in the geriatric syndrome of frailty: a pilot study. *J Am Geriatr Soc*. 2002;50(7):1268-1271.
- (6) Effros RB, Cai Z, Linton PJ. CD8 T cells and aging. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(1-2):45-64.
- (7) Goronzy JJ, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(5):468-475.
- (8) Huang H, Patel DD, Manton KG. The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells. *Front Biosci*. 2005;10:192-215.
- (9) Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol*. 2004;39(5):687-699.
- (10) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-1164.
- (11) Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209-226.
- (12) Fisson S, rrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R et al. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med*. 2003;198(5):737-746.
- (13) Cozzo C, Larkin J, III, Caton AJ. Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;171(11):5678-5682.
- (14) Thompson KR, Mikesky AE, Bahamonde RE, Burr DB. Effects of physical training on proprioception in older women. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2003;3(3):223-231.
- (15) Kondo N, Nomura M, Nakaya Y, Ito S, Ohguro T. Association of inflammatory marker and highly sensitive C-reactive protein with aerobic exercise capacity, maximum oxygen uptake and insulin resistance in healthy middle-aged volunteers. *Circ J*. 2005;69(4):452-457.

- (16) Kullo IJ, Khaleghi M, Hensrud DD. Markers of inflammation are inversely associated with VO₂ max in asymptomatic men. *J Appl Physiol*. 2007;102(4):1374-1379.
- (17) LaMonte MJ, Yanowitz FG. Aerobic exercise for lowering blood pressure: a metaanalysis. *Clin J Sport Med*. 2002;12(6):407.
- (18) 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):960-964.
- (19) Ramos L. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso. *Cadernos de Saúde Pública*. 2003;19(3):793-798.
- (20) Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Minimal" state: A practical method for grading the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12:129-132.
- (21) Bertolucci M. O mini-exame do estado mental em uma população geral. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 1994;52(1):1-7.
- (22) Figueiredo IM, Sampaio RF, Mancini MC, Silva FCM, Souza MAP. Teste de força de preensão utilizando o dinamômetro Jamar. *Acta Fisiátrica*. 2007;14(2):104-110.
- (23) Perrin DH. *Isokinetic Exercise and Assessment*. Champaign: 1993.
- (24) Kryger AI, Andersen JL. Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scand J Med Sci Sports*. 2007;17(4):422-430.
- (25) Fretwell M. Acute hospital care for frail older patients. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1993:241-248.
- (26) Fried LP, Walston J. Frailty and failure to thrive. In: Hazzard WR, Blass JP, Ettinger WHJ, Halter JB, Ouslander J, eds. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 5th ed. New York: McGraw-Hill; 2003:1487-1502.
- (27) Buchner DM, Wagner EH. Preventing frail health. *Clin Geriatr Med*. 1992;8(1):1-17.
- (28) Lipsitz LA, Goldberger AL. Loss of 'complexity' and aging. Potential applications of fractals and chaos theory to senescence. *JAMA*. 1992;267(13):1806-1809.
- (29) Cohen HJ, Harris T, Pieper CF. Coagulation and activation of inflammatory pathways in the development of functional decline and mortality in the elderly. *Am J Med*. 2003;114(3):180-187.
- (30) Pawelec G, Barnett Y, Forsey R, Frasca D, Globerson A, McLeod J et al. T cells and aging, January 2002 update. *Front Biosci*. 2002;7:d1056-d1183.
- (31) Gregg R, Smith CM, Clark FJ, Dunnion D, Khan N, Chakraverty R et al. The number of human peripheral blood CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol*. 2005;140(3):540-546.
- (32) Hwang KA, Kim HR, Kang I. Aging and human CD4⁺ regulatory T cells. *Mech Ageing Dev*. 2009;130(8):509-517.
- (33) Latham NK, Anderson CS, Lee A, Bennett DA, Moseley A, Cameron ID. A randomized, controlled trial of quadriceps resistance exercise and vitamin D in frail older people: the

- Frailty Interventions Trial in Elderly Subjects (FITNESS). *J Am Geriatr Soc.* 2003;51(3):291-299.
- (34) Gill TM, Baker DI, Gottschalk M, Peduzzi PN, Allore H, Byers A. A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home. *N Engl J Med.* 2002;347(14):1068-1074.
- (35) Walston J, Hadley EC, Ferrucci L, Guralnik JM, Newman AB, Studenski SA et al. Research agenda for frailty in older adults: toward a better understanding of physiology and etiology: summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. *J Am Geriatr Soc.* 2006;54(6):991-1001.
- (36) Arantes PMM, Alencar MA, Dias RC, DIAS JMD, Pereira LSM. Atuação da fisioterapia na síndrome de fragilidade: revisão sistemática. *Rev Bras Fisioter.* 2010;13(5):365-375.
- (37) Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005;98(4):1154-1162.
- (38) Pedersen BK, Febbraio MA. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol.* 2007;102(2):814-816.

Artigo 2

Physical Therapy intervention increases plasma Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels in pre-frail elderly women.

Coelho FM¹, Pereira DS¹; Lustosa LP¹; Silva JP¹; Dias, JMD¹; Dias, RCD¹; Teixeira AL²; Teixeira MM³; Pereira LSM¹.

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, Departamento de Fisioterapia da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional¹, Faculdade de Medicina², Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas³.

Abstract

Background: BDNF has been related to neuroprotection in a series of central nervous system diseases and is an important link in disease network and multimorbidity in older age. Physical training of moderate intensity increases both basal as well as exercise-induced plasma BDNF concentrations. **Objective:** To assess the impact of a physical therapy intervention on BDNF levels in elderly women, classified according to Fried phenotype (non-frail and pre-frail). **Methods:** A convenience sample of 48 elderly women was randomly selected. The physical therapy intervention group was composed by 20 elderly women selected from this group. Plasma neurotrophic factors (BDNF, GDNF and NGF) were measured by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Also, clinical parameters were analyzed, such as TUG, Hand grip and Work/body weight before and after intervention. **Results:** Plasma concentrations of BDNF were significantly higher in non-frail in comparison to pre-frail elderly women. After the physical therapy protocol higher levels of BDNF were found in elderly women (before 351.4 ± 67.5 pg/mL and after 592.9 ± 78.9 pg/mL; $p < 0.001$). Both groups had an increase in BDNF levels after the physical therapy protocol. Levels of GDNF and NGF were low or under the detection limit in most subjects and there was no difference in median levels between these two populations. **Conclusions:** The low levels of BDNF in pre-frail elderly women suggest that this neurotrophic factor may be a key pathophysiological mediator in the syndrome of frailty. The fact that physical therapy protocol increased BDNF levels in both groups suggests that may be possible to modify this phenotype.

Introduction

The neurotrophin family is a group of small, basic, secreted proteins that aid in the differentiation, survival and maintenance of specific neuronal populations. This family includes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), nerve growth factor (NGF) and neurotrophins (NT) 3, 4/5, and 6¹. In the periphery BDNF is found in the plasma, serum and platelets² and it is produced by vascular endothelial cells and by peripheral blood mononuclear cells³.

BDNF and other neurotrophic factors may be an important factor in old-age survival because of its role in preventing neuronal death during stress⁴ and in synaptic plasticity^{5, 6}. It also promotes the development of immature neurons and enhances the survival of adult ones⁷. BDNF binds with high affinity to the tyrosine receptor kinase B (trkB), which is coupled to insulin signal transduction through the insulin receptor substrate-1/ phosphoinositide 3-kinase/protein kinase (IRS-1/PI3K/PKB-Akt) pathway. Scalzo et al⁸ found increased BDNF levels among Parkinson disease patients who had a longer history of disease and presented more severe symptoms. This is an apparent paradox since decreased BDNF levels were expected to emerge as the disease progressed. The author suggests that higher BDNF levels with Parkinson disease progression may be a compensatory mechanism in the advanced stages of the disease. Moreover, proinflammatory cytokines enhance BDNF secretion by monocytes in vitro⁹ but it can also reduce inflammation in mouse models¹⁰, suggesting a regulatory role for BDNF in inflammation.

Recently Krabbe et al.¹¹ showed that low plasma BDNF relates to high mortality risk in older women independently of education, morbidity, and low-grade inflammation, confirming the hypothesis that circulating BDNF is an important link in disease network

and multimorbidity in older age. Also, altered BDNF levels have been described in several neurological and psychiatric disorders including Alzheimer's disease^{12, 13}, Huntington's disease¹⁴, major depression¹⁵, bipolar disorder¹⁶ and schizophrenia^{16, 17}.

Frailty is a commonly used term indicating older persons at increased risk for morbidity and mortality¹⁸. There is general agreement that frailty is not adequately defined as purely a decline in functional status, although functional status is itself a predictor of poor outcome^{19, 20}. Fried and colleagues²¹ have provided a specific list of objective, measurable criteria for frailty. Using their definition, they found frailty to be present in 6.9% of older community-dwelling persons and to be more common in women.

Physical exercise is not only beneficial in preventing cardiovascular diseases, it also enhance brains health and plasticity²². Exercise improves neurological health and decreases negative mood²³. Also, in depressed patients voluntary exercise produced antidepressant effect²⁴. Moreover, Zoladz et al.²⁵ postulated that endurance training of moderate intensity has bimodal influence on the BDNF, i.e. it increases both basal as well as exercise-induced plasma BDNF concentrations in young healthy men.

In this context, the aim of this study was to assess the impact of a physical therapy intervention on BDNF levels in elderly women. Then, classification according to Fried phenotype²¹ (non-frail and pre-frail) was done and BDNF levels assessed. Clinical parameters were tested to evaluate the improvement associated with the intervention. We suggested that this physical intervention should result in an increase on BDNF on this population with a frailty profile.

2. Material and methods

This is a quasi-experimental study that includes women from the general community of the city of Belo Horizonte, Brazil. The project was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais n° ETIC 008/09.

2.1. Sample

A convenience sample of 48 elderly women was randomly selected and parameters for the frailty phenotype were assessed. The physical therapy intervention group was composed by 20 elderly women selected from this group. The feminization of the elderly population leads to a greater prevalence of chronic illnesses and disability²⁶. Only women were included so as to avoid a gender bias regarding muscle strength and the health status of the sample. The exclusion criteria were: acute inflammatory condition or active neoplasm in the previous five years; use of medication with broad-based action on the immune system; amputation or fracture of the upper or lower limbs in the previous six months; presence of any neurological diseases; and cognitive alterations detected by the Mini-Mental Status Examination^{27, 28}.

2.2. BDNF, GDNF and NGF measurement

Five millimeters (ml) of blood were collected from the ulna vein of the participants in Vacutainers with citrate by a qualified healthcare professional, complying with the norms for the use of sharp instruments in an aseptic environment. The blood was then centrifuged and the plasma was removed in a sterile environment and stored in eppendorf

tubes in a freezer at -30° C. Plasma neurotrophic factors were measured according to the procedures supplied by the manufacturer performed through sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits for BDNF, GDNF and NGF (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA).

The results are presented in picograms per ml (pg/mL). Readings were performed by a single microplate reader adjusted to 490nm and wave length correction at 650nm at the Immunopharmacology Laboratory of the Biological Sciences Institute of the University.

2.3. MMSE and GDS

The Mini-Mental Status Examination (MMSE) adapted for the Brazilian population was used to assess cognitive performance, considering cutoff points of 13 for illiterate individuals, 18 for those with 1 to 7 years of schooling and 26 for those with 8 or more years of schooling^{27, 28}.

The Geriatric depression scale (GDS) was used to determine a screening performance for the detection of major depression, a well-validated tool in elderly people^{29, 30}. The GDS-15 has been widely recommended as a brief screening instrument for late-life depression and has been found to be useful in detecting late-life major depression in primary care settings³⁰. The GDS-15 is scored dichotomously (yes/no) and inquires into subjective depression experienced during the prior week, 15, with a cutoff point of 5/6 (non-case/case).

2.4. Frailty Phenotype

The weight loss variable in the phenotype proposed by Fried et al.²¹ was collected by means of the following question: “Have you lost more than 4.5 Kg in the last year unintentionally (that is, without diet or exercise)?”. The exhaustion criterion for the frailty phenotype was assessed through two items on the CES-D questionnaire: Item 7 (“I felt that everything I did was an effort”) and Item 20 (“I could not get “going”). Both items should be answered considering the week prior to the administration of the questionnaire. Energy expenditure was measured using the Minnesota Leisure Time Activity Questionnaire. Grip strength – another phenotype criterion was measured using a JAMAR dynamometer (model PC5030JI), with the positioning of the volunteer following the recommendations of the American Society of Hand Therapists and considering the mean of three measurements³¹. Slowness was assessed by the time (in seconds) spent walking a distance of 4.6 metres. All criteria adopted the classification cutoff points for frail and non-frail individuals proposed by Fried et al.²¹. Those with three or more of these criteria were considered frail; individuals with one or two of the criteria were considered pre-frail; and individuals with none of these criteria were considered non-frail²¹.

2.5. Measurement of muscle strength

A Biodex Systems 3 Pro (Biodex Medical Systems, Shirley, NY, USA) isokinetic dynamometer was used to assess the muscle strength of the quadriceps and hamstrings groups. This instrument has been accepted as the “gold standard” for assessment of muscular performance³². The entire procedure was done according to the manufacturer’s instructions. A 10 minute walk was completed, as an MMII muscle warm-up, prior to the assessment on the isokinetic dynamometer.

Muscle performance was assessed on the dominant leg at angular speeds of 60°/s and 180°/s in concentric contractions, with five and fifteen repetitions respectively, at intervals of 30 seconds between each velocity. Participants initially familiarized themselves with the instrument by practicing an average of three times at sub-maximum force. The torque produced by the leg was then measured to correct for the effect of gravity. These results are presented in Newtons/meter (Nm) for peak torque and percentage in work per body weight for dominant knee movements.

2.6. Time Up and Go

The Timed Up and Go (TUG) test was introduced in 1991 by Podsiadlo and Richardson as a modification of the Get-Up and Go Test of Mathias et al.³³. The procedure Podsiadlo and Richardson described for the TUG required documenting the time in seconds that subjects required to: “rise from a standard arm chair, walk to a line on the floor 3 meters away, turn, return, and sit down again.” They and others have reported that the TUG can be performed reliably. The TUG has also been shown to have validity by virtue of its correlation with measures such as the Berg Balance Scale, gait speed/time, stair climbing, and functional indexes and by its ability to discriminate between patients on the basis of residential status, falls, and mortality³³.

2.7. Intervention

The training group conducted a 10-week progressive dynamic resistance-training program of knee extensors and flexors, three times per week. Each session lasted 60 min and began with a 5-10 min warm-up followed by straining exercises for muscles of the

lower extremities. Next, the maximal resistance (RM) was established in order to assess the correct relative training load for each subject. During the first 2 weeks, the training load was set at 50% of the amount of weight that could be lifted once (1RM). From weeks 2 to 10, each session consisted of three sets of eight repetitions with a load equivalent to 75% of the 1RM. 1RM was tested on 5 and 8 weeks and the resistance adjusted to maintain a progressive training stimulus³⁴. All training sessions were surveyed and supervised by a physiotherapist.

2.8. Statistical Analysis

All variables were tested for normality of distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Taking into account that variables displayed normal distribution, differences between two groups were evaluated using the Paired t-test (for before and after the intervention) and Unpaired t-test (for non-frail and pre-frail individuals). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences, SPSS 12.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Table 1 displays the clinical and demographic characteristics of the elderly women, such as age, body mass index (BMI), number of chronic illnesses, education (years), MMSE, GDS, Hand grip (Kgf), BDNF (pg/ml), NGF (pg/ml) and GDNF (pg/ml).

First, experiments were conducted to evaluate the difference between non-frail and pre-frail elderly women on neurotrophic factors production. Plasma concentrations of BDNF were detected in all individuals and were significantly higher in non-frail in comparison to pre-frail elderly women (non-frail 863.8 ± 207.6 pg/mL and pre-frail 543.2 ± 44.1 pg/mL; $p < 0.0001$) (**Figure 1 A**). In TUG test pre-frail elderly spent more time to walk 3 meters in comparison to non-frail ones (**Figure 1 B**), demonstrating a poorer motor performance in pre-frail group subjects.

Next, BDNF levels were measured in two situations: before and after the intervention. Results demonstrate that after the physical therapy protocol higher levels of BDNF were found in elderly women (before 351.4 ± 67.5 pg/mL and after 592.9 ± 78.9 pg/mL; $p < 0.001$) (**Figure 2A**). To study the influence of frailty phenotype on BDNF levels before and after the intervention the subjects were divided into two subgroups: non-frail (**Figure 2B**) and pre-frail individuals (**Figure 2C**). Both groups had an increase in BDNF levels after the physical therapy protocol.

Then, we observed the clinical parameters, such as TUG, Hand grip (Kgf) and Work/body weight (%) before and after intervention (**Table 2**). This change in Work/body weight after the physical therapy protocol demonstrates that it was effective in increasing muscle strength.

Levels of GDNF and NGF were low or under the detection limit in most subjects and there was no difference in median levels between these two populations (**Table 1**). Also, the protocol was not able to change these neurotrophic factors.

4. Discussion

As far as we know, there is no study relating BDNF levels and frailty phenotype. In the present study, higher basal levels of BDNF were found on non-frail in comparison to pre-frail elderly women. Furthermore, physical therapy intervention increased plasma BDNF levels independently of the frailty phenotype. These findings suggest that circulating BDNF is somehow linked to frailty phenotype network in old age and that physical therapy intervention may be an important therapeutic strategy. So, our data seems to corroborate other studies that showed that physical therapy has an important impact over frailty syndrome.

An emerging fundamental concept is that brain health and cognitive function are modulated by the interplay of various central and peripheral factors. Specifically, brain function is compromised by the presence of peripheral risk factors for cognitive decline, including hypertension, hyperglycemia, insulin insensitivity and dyslipidemia – a cluster of features that have been conceptualized as the “metabolic syndrome”³⁵. A common feature of many of these conditions is systemic inflammation, which contributes to most if not all of the conditions of the metabolic syndrome. Furthermore, systemic inflammation exacerbates CNS inflammation³⁶ and correlates with cognitive decline³⁷. Aging is accompanied by a chronic pro-inflammatory state, due to continuous antigenic stress that impinges upon innate immunity, throughout life, and has potential implications for the onset of inflammatory diseases³⁸. So, immunosenescence refers to the gradual age-related deterioration or modification of the immune system³⁹.

Exercise is thus uniquely positioned to improve brain health and function by reducing the peripheral risk factors for cognitive decline and, in parallel, by directly enhancing brain health and cognitive function. Our results are in line with previous works

that have detected increased levels of BDNF after physical therapy intervention. This is also in accordance with other researchers' findings, for example Rojas Vega et al, 2006, postulated that the exercise-induced peripheral increase in BDNF may help to increase the brain resistance to damage and neurodegradation that occurs with age.

Many studies have documented evidences of decreased expression of BDNF in different neurodegenerative diseases^{8, 12, 14}. However, much less is known about the effect of exercise on BDNF levels. Neeper et al.⁴⁰ have shown that physical exercise can increase BDNF gene expression in specific brain region of rat. Moreover, the authors postulated that physical exercise induced up-regulation of BDNF could help increase the brain resistance to damage and degeneration through BDNF's support of neuronal growth, function and survival. Since that time, the original findings have been confirmed by this author Neeper et al.⁴¹ and others^{42, 43}. Gustafsson⁴⁴ observed an acute effect in plasma BDNF in response to exercise, with a significant increase in maximal workload in both female and male patients.

Frailty is the precursor of functional deterioration, which leads to recurrent hospitalization, institutionalization, and death^{20, 45-47}. There are many parameters associated with frailty, including chronological age, genes, and previous education level^{21, 48, 49}. Based on the literature, Morley et al.⁵⁰ suggest that there are four major intrinsic factors sarcopenia and related metabolic pathogenic factors, atherosclerosis, cognitive impairment, and malnutrition that are responsible for the pathogenesis of frailty. Thus, frail persons have a decreased social activity, sedentarism and sarcopenia^{21, 51, 52} and appear to be at an increased risk of developing stroke⁵³. Krabbe et al.¹¹ concluded that low plasma BDNF relates to high mortality risk in older women independently of baseline functional status, education, morbidity and low-grade inflammation. The lower levels of BDNF found in pre-frail elderly women in the present study suggests that this mediator count as a key

pathophysiological factor in the syndrome of frailty. The fact that physical therapy protocol increased BDNF levels in both groups suggests that is possible to modify this phenotype. The purpose of using measures of functional mobility, such as TUG during rehabilitation is to quantify the individual's mobility level at different intervals and to quantify improvements. When using the TUG, clinicians need to ensure that the time recorded for an individual represents the best obtainable time (in seconds). All patients in the present study improved the TUG performance, presenting a faster gait speed after the physical therapy protocol.

It is known that BDNF is the most widely distributed neurotrophin in the central nervous system and we suggest that it is also a better marker for frailty phenotype. In conclusion, improvement of clinical parameters associated with higher BDNF levels after intervention could point to a neuroprotective role for BDNF in this context of frailty phenotype..

Reference

- (1) Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004;10(11):123-131.
- (2) Yamamoto H, Gurney ME. Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*. 1990;10(11):3469-3478.
- (3) Sarchielli P, Greco L, Stipa A, Floridi A, Gallai V. Brain-derived neurotrophic factor in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2002;132(1-2):180-188.
- (4) Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007;38(7):2165-2172.
- (5) Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci*. 2007;10(9):1089-1093.
- (6) Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci*. 2004;27(10):589-594.
- (7) Lindsay RM. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging*. 1994;15(2):249-251.
- (8) Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2009.

- (9) Schulte-Herbrüggen O, Nassenstein C, Lommatzsch M, Quarcoo D, Renz H, Braun A. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol.* 2005;160(1-2):204-209.
- (10) Makar TK, Trisler D, Sura KT, Sultana S, Patel N, Bever CT. Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 2008;270(1-2):70-76.
- (11) Krabbe KS, Mortensen EL, Avlund K, Pedersen AN, Pedersen BK, Jorgensen T et al. Brain-derived neurotrophic factor predicts mortality risk in older women. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57(8):1447-1452.
- (12) Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 2008;7(Suppl 1):43-56.
- (13) Yasutake C, Kuroda K, Yanagawa T, Okamura T, Yoneda H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;256(7):402-406.
- (14) Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144B(4):574-577.
- (15) Laske C, Stransky E, Eschweiler GW, Klein R, Wittorf A, Leyhe T et al. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *J Psychiatr Res.* 2007;41(7):600-605.

- (16) Gama CS, Andreazza AC, Kunz M, Berk M, Belmonte-de-Abreu PS, Kapczinski F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2007;420(1):45-48.
- (17) Reis HJ, Nicolato R, Barbosa IG, Teixeira do Prado PH, Romano-Silva MA, Teixeira AL. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2008;439(2):157-159.
- (18) Gillick M. Pinning down frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(3):M134-M135.
- (19) Buttar A, Blaum C, Fries B. Clinical characteristics and six-month outcomes of nursing home residents with low activities of daily living dependency. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(5):M292-M297.
- (20) Rockwood K, Stolee P, McDowell I. Factors associated with institutionalization of older people in Canada: testing a multifactorial definition of frailty. *J Am Geriatr Soc*. 1996;44(5):578-582.
- (21) Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J et al. Frailty in older adults: Evidence for a Phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56A(3):M146-M156.
- (22) Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*. 2002;25(6):295-301.
- (23) Hansen S, Kvorning T, Kjaer M, Sjogaard G. The effect of short-term strength training on human skeletal muscle: the importance of physiologically elevated hormone levels. *Scand J Med Sci Sports*. 2001;11(6):347-354.

- (24) Singh NA, Clements KM, Singh MA. The efficacy of exercise as a long-term antidepressant in elderly subjects: a randomized, controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56(8):M497-M504.
- (25) Zoladz JA, Pilc A, Majerczak J, Grandys M, Zapart-Bukowska J, Duda K. Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. *J Physiol Pharmacol*. 2008;59(Suppl 7):119-132.
- (26) Ramos L. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso. *Cad Saude Publica*. 2003;19(3):793-798.
- (27) Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12:129-138.
- (28) Bertolucci M. O mini-exame do estado mental em uma população geral. *Arquivos de Neuropsiquiatria*. 1994;52(1):1-7.
- (29) Yesavage JA, Brink TL, Rose TL, Lum O, Huang V, Adey M. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. *J Psychiatr Res*. 1982;17:37-49.
- (30) Marc LG, Raue PJ, Bruce ML. Screening performance of the 15-item geriatric depression scale in a diverse elderly home care population. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008;16(11):914-921.
- (31) Figueiredo IM, Sampaio RF, Mancini MC, Silva FCM, Souza MAP. Teste de força de preensão utilizando o dinamômetro Jamar. *Acta Fisiátrica*. 2007;14(2):104-110.

- (32) Perrin DH. *Isokinetic Exercise and Assessment*. Champaign: 1993.
- (33) Podsiadlo D, Richardson S. The Timed Up & Go: a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc*. 1991;39:142-148.
- (34) Kryger AI, Andersen JL. Resistance training in the oldest old: consequences for muscle strength, fiber types, fiber size, and MHC isoforms. *Scand J Med Sci Sports*. 2007;17:422-430.
- (35) Yaffe K. Metabolic syndrome and cognitive disorders: is the sum greater than its parts? *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2007;21(2):167-171.
- (36) Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav Immun*. 2004;18(5):407-413.
- (37) Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI et al. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline. *JAMA*. 2004;292(18):2237-2242.
- (38) Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(1):83-91.
- (39) Thoman ML, Weigle WO. The cellular and subcellular bases of immunosenescence. *Adv Immunol*. 1989;46(221):261.
- (40) Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 1995;373(6510):109.

- (41) Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 1996;726(1-2):49-56.
- (42) Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience.* 2004;124(1):71-79.
- (43) Adlard PA, Perreau VM, Engesser-Cesar C, Cotman CW. The timecourse of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise. *Neurosci Lett.* 2004;363(1):43-48.
- (44) Gustafsson G, Lira CM, Johansson J, Wisén A, Wohlfart B, Ekman R et al. The acute response of plasma brain-derived neurotrophic factor as a result of exercise in major depressive disorder. *Psychiatry Res.* 2009;169(3):244-248.
- (45) Newman AB, Gottdiener JS, Mcburnie MA, Hirsch CH, Kop WJ, Tracy R et al. Associations of subclinical cardiovascular disease with frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2001;56(3):M158-M166.
- (46) Rozzini R, Sabatini T, Barbisoni P, Bellelli G, Trabucchi M. Dementia is a major predictor of death among the Italian elderly. *Neurology.* 2000;54(4):1014.
- (47) Carlson JE, Zocchi KA, Bettencourt DM, Gambrel ML, Freeman JL, Zhang D et al. Measuring frailty in the hospitalized elderly: concept of functional homeostasis. *Am J Phys Med Rehabil.* 1998;77(3):252-257.
- (48) Wienke A, Lichtenstein P, Yashin AI. A bivariate frailty model with a cure fraction for modeling familial correlations in diseases. *Biometrics.* 2003;59(4):1178-1183.

- (49) Varcasia O, Garasto S, Rizza T, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Bathum L et al. Replication studies in longevity: puzzling findings in Danish centenarians at the 3'APOB-VNTR locus. *Ann Hum Genet.* 2001;65(4):371-376.
- (50) Morley JE, Perry HM, Miller DK. Something about frailty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2002;57(11):M698-M704.
- (51) Smith J, Baltes MM. The role of gender in very old age: profiles of functioning and everyday life patterns. *Psychol Aging.* 1998;13(4):676-695.
- (52) Raphael D, Cava M, Brown I, Renwick R, Heathcote K, Weir N et al. Frailty: a public health perspective. *Can J Public Health.* 1995;86(4):224-227.
- (53) Bushnell CD, Colón-Emeric CS. Secondary stroke prevention strategies for the oldest patients: possibilities and challenges. *Drugs Aging.* 2009;26(3):209-230.

Legend

Figure 1: Comparison between non-frail (n=18) and pre-frail (n=25) elderly women on the BDNF levels (pg/ml) (A) and Time up and Go (B). The p value refers to comparison between groups using Unpaired t-test. The bar represents median value. *p<0.001.

Figure 2: Comparison between before (n=20) and after (n=20) a Physical Therapy protocol in elderly women on the BDNF levels (pg/ml) (A). Subjects were divided into two subgroups according to frailty phenotype: non-frail (n=10) (B) and pre-frail (n=10) individuals (C). The p value refers to comparison between groups using Paired t-test. The bar represents median value. *p<0.001.

Figure 1

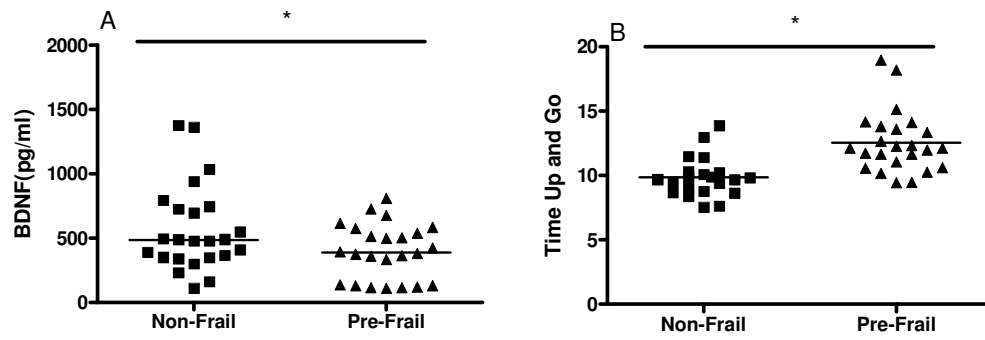


Figure 2

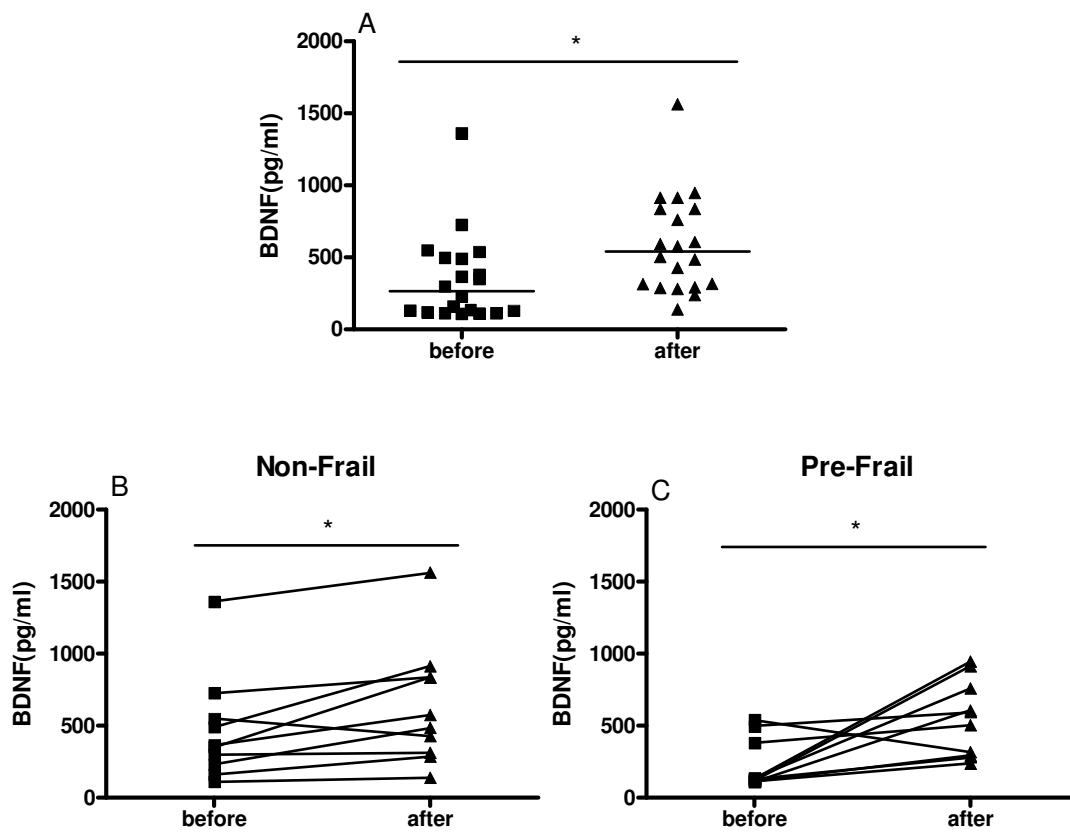


Table 1. Clinical and demographic characteristics of the elderly women

Variables	Frailty (n= 48)	
	Non-Frail (n=24)	Pre-Frail (n=24)
Age	70.5 ± 4.6	72.5 ± 4.3
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 4.6	30.2 ± 5.7
Number of chronic illnesses	2.6 ± 1.5	3.4 ± 1.8
Education (years)	6.4 ± 3.7	4.5 ± 4.0
MMSE	26.0 ± 3.7	23.7± 4.7
GDS	2.3 ± 2.4	4.0 ± 2.7
Hand Grip (Kgf)	23.0 ± 3.4	21.2 ± 5.5
BDNF (pg/ml)	569.5 ± 336.6	396.4 ± 215.1
NGF (pg/ml)	21.5 ± 46.8	108.6 ± 356.5
GDNF (pg/ml)	-15.6 ± 40.0	123.7 ± 438.3

BMI= Body mass index; **MMSE=** Mini-Mental Status Examination

Table 2. BDNF, TUG, hand grip and work per body weight before and after intervention

Variables	Physical Therapy Intervention		
	Pre	Post	Paired T test
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	P value
BDNF	353.3 \pm 300.4	583.5 \pm 351.7	0.002
TUG	11.0 \pm 2.0	9.8 \pm 1.4	0.002
Hand Grip (Kgf)	21.6 \pm 4.1	22.3 \pm 4.9	0.215
Work/body Weight (%)	114.7 \pm 36.7	121.1 \pm 38.6	0.015

BDNF = Brain-derived neurotrophic factor; **TUG**= Timed Up and Go

Considerações Finais

Levando em consideração a proposta do programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, esta tese, desenvolvida sob orientação da professora doutora Leani Souza Máximo Pereira e co-orientação do professor doutor Mauro Martins Teixeira, esteve totalmente inserida no escopo do desempenho funcional humano. O tema central desta tese abrange áreas distintas do conhecimento, como as ciências básicas e a reabilitação, possibilitando o estudo de mecanismos associados ao processo do envelhecimento, da Síndrome da Fragilidade, e do impacto de um protocolo de exercícios físicos sobre o sistema imunológico. A Síndrome da Fragilidade é ainda um conceito novo, e que, portanto, ainda precisa ser melhor compreendido no aspecto geral. Neste trabalho classificamos as idosas de acordo com os critérios pré-estabelecidos por Fried, que são considerados o padrão ouro e analisamos a frequência de células T regulatórias e a produção de citocinas. Quando analisamos as células observamos que frente ao estímulo no momento pós-intervenção as idosas reagiram com um perfil menos inflamatório e pelo contrário mais anti-inflamatório.

Além disso, fatores neurotróficos também parecem estar envolvidos nessa rede de modificações imunológicas que levam ao aumento de morbidade e mortalidade associada ao processo de envelhecimento.

Nesse contexto, analisamos o BDNF e mostramos que a fragilidade está associada a uma redução deste fator neurotrófico e que exercícios são capazes de modificar a liberação sistêmica deste marcador.

A pesquisa realizada neste doutorado tem um papel importante para comunidade científica e para a prática clínica da Fisioterapia, considerando que pode auxiliar na sistematização e norteamento de indivíduos com esta condição de saúde.

Referências

Bibliográficas

4. Referencias Bibliográficas

1. ABBAS, A., LICHTMAN, A. *Imunologia Celular e Molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2005.
2. BARBIERI, M. et al. Chronic inflammation and the effect of IGF-I on muscle strength and power in older persons. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2003;284:E481-E487.
3. BAUTMANS, I. et al. Circulating acute phase mediators and skeletal muscle performance in hospitalized geriatrics patients. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2005;60A(3):361-7.
4. BEHARKA, A. A. et al. Interleukin-6 production does not increase with age. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2001;56:B81-B88.
5. BERQUÓ E. Algumas considerações demográficas sobre o envelhecimento da população no Brasil. *Anais Seminário internacional: Envelhecimento populacional: uma agenda para o final do século*. 1996;16-34.
6. BERTOLUCCI M. O mini-exame do estado mental em uma população geral. *Arq Neuropsiquiatr* 1994; 52(1):1-7.
7. BOHANNON RW. Reference values for the Timed Up and Go Test: A descriptive Meta-Analysis. *Journal of Geriatric Physical Therapy* 2006;29:64-8.
8. BONAFÈ, M. et al. A gender-dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *European Journal of Immunology*. 2001;31:2357-61.
9. BRUDER, D., M. PROBST-KEPPER, et al. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 623-30.

10. BRUUNSGAARD H, PEDERSEN AN *et al.* Proliferative responses of BMNC in a cohort of elderly humans: role of lymphocyte phenotype and cytokine production *Clin Exp Immunol* 2000; 119:433-40.
11. CARVALHO, J. A. M.; GARCIA, R. A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. *Cadernos De Saúde Pública*. Rio de Janeiro,2003;19(3):725-33.
12. CARVALHO, J. A. M.; RODRIGUEZ-WONG, L. L. A transição da estrutura etária da população brasileira na primeira metade do século XXI. *Cadernos de Saúde Pública*. Rio de Janeiro,2008;24(3):597-605.
13. CHAIMOWICZ F. A saúde do idoso brasileiro às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. *Rev Saúde Pub*. 1997;31(2):184-200.
14. CHRISTIANSEN, L. *et al.* Modest implication of interleukin-6 promoter polymorphisms in longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*.2004;125:391-5.
15. CIAMMOLA A, SASSONE J, CANNELLA M, CALZA S, POLETTI B, FRATI L *et al.* Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B(4):574-577.
16. COLLAZIOL D, LUZ C *et al.* Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing *Mechanisms Ageing Development* 2004;125:219-227.
17. DAMOISEAUX J. Regulatory T cells: back to the future. *Neth J Med* 2006;64:4-9.
18. DOHERTY, T. J. Invited review: aging and sarcopenia. *Journal Applied Physiology*. 2003;95:1717-27.
19. ERSHLER, W. B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *Journal American Geriatrics Society*. 1993;41:176-81.
20. EYIGOR S, KARAPOLAT H, DURMAZ B. Effects of a group-based exercise program on the physical performance, muscle strength and quality of life in older women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. *In press*. 2007
21. FEBBRAIO, M. A.; PEDERSEN, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB Journal*.2002;16:1335-47.

22. FERRUCCI L, HARRIS TB, GURALNIK JM, TRACY RP, CORTI M-C, COHEN HJ, et al. Serum IL-6 level and the development of disability in older persons. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1999;47(6):639-46.
23. FERRUCCI, L. et al. Change in Muscle Strength Explains Accelerated Decline of Physical Function in Older Women With High Interleukin-6 Serum Levels. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2002;50(12):1947-54.
24. FERRUCCI, L. et al. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 2005;105(6):2294-99.
25. FIGUEIREDO IM, SAMPAIO RF, MANCINI MC, SILVA FCM, SOUZA MAP. Teste de força de preensão utilizando o dinamômetro Jamar. *Acta Fisiátrica* 2007;14(2):104-10.
26. FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukine-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and association with systemic-onset Juvenile Chronic Arthritis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;102:1369-76.
27. FONTENOT, J. D., M. A. GAVIN, et al. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, 4: 330-6.
28. FORSEY, R. J. et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2003;124(4):487-93.
29. FRIED LP, TANGEN CN, WALSTON J et al. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2001;56:146-56.
30. FRIED, L. P. et al. Untangling the Concepts of Disability, Frailty, and Comorbidity: Implications for improved targeting and care. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2004;59A(3):255-63.
31. FURTADO, G. C., M. A. CUROTTO DE LAFAILLE, et al. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002;196: 851-7.
32. GAMA CS, ANDREAZZA AC, KUNZ M, BERK M, BELMONTE-DE-ABREU PS, KAPCZINSKI F. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in

- patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2007;420(1):45-48.
33. GARRIDO R, MENEZES PR. O Brasil está envelhecendo: boas e más notícias por uma perspectiva epidemiológica. *Rev Brasil Psiquiat*. 2002;24(1):3-6.
 34. GRIMBLE, R. F. Inflammatory response in the elderly. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2003;6:21-9.
 35. HADDAD, F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98:911-17.
 36. HUANG MH, LIN YS, YANG RC, LEE CL. A comparison of various therapeutic exercises on the functional status of patients with knee osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;32(6):398-406.
 37. JANSSEN I et al. The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *JAGS*; 2004;52:80-5.
 38. JENNY, N. S. et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22:2066-71.
 39. KIECOLT-GLASER, J. K. et al. Chronic stress and age-related increases in the pro-inflammatory cytokine IL-6. *Proceedings of the National Academy Sciences*. 2003;100(15):9090-95.
 40. KRABBE KS, PERDERSEN M, BRUUNSGAARD H. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*; 2004;39(5):687-99.
 41. LASKE C, STRANSKY E, ESCHWEILER GW, KLEIN R, WITTORF A, LEYHE T et al. Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *J Psychiatr Res*. 2007;41(7):600-605.
 42. LINDSAY RM. Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor. *Neurobiol Aging*. 1994;15(2):249-251.
 43. LINTON PJ, DORSHKIND K. Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5:1333-9.

44. MACIEL ACC, GUERRA RO. Prevalência e fatores associados ao déficit de equilíbrio em idosos. *Rev Bras Ciências e Mov.* 2005;13(1):37-44.
45. MAGGIO, M. et al. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *Journal of Gerontology Medical Sciences.* 2006;61A(6):575-84
46. MAKAR TK, TRISLER D, SURA KT, SULTANA S, PATEL N, BEVER CT. Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 2008;270(1-2):70-76.
47. MALY MR, COSTIGAN PA. Determinants of self efficacy for physical tasks in people with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2006;55(1):94-1001.
48. MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 2007;10(9):1089-1093.
49. MARTINOWICH K, MANJI H, LU B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 2007;10(9):1089-1093.
50. MASTRO AM, SCHLOSSER DA, GROVE DS, LINCOSKI C, PISHAK SA, GORDON S, KRAEMER WJ. Lymphocyte subpopulations in lymphoid organs of rats after acute resistance exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1999;31(1):74-81.
51. MATIELLO-SVERZUT AC. Histopatologia do músculo esquelético no processo de envelhecimento e fundamentação para a prática terapêutica de exercícios físicos e prevenção da sarcopenia. *Rev. Fisioter. Univ. São Paulo.* 2003;10:24-33.
52. MCGIBBON CA, KREBS DE. Compensatory gait mechanics in patients with unilateral knee arthritis. *J Rheumatol.* 2002;29:2410-9.
53. MILLER RA. The aging immune system : primer and prospectus *Science* 1996; 273:70-4.
54. MOHAMED-ALI, V. et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1997;82:4196-4200.
55. MORLEY, J. E. et al. Frailty. *The Medical Clinics of North America.* 2006;90:837-47.

56. MORLEY, J. E.; BAUMGARTNER, R. N. Cytokine-related aging process. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2004;59A(9):924-29.
57. MUELLER O, VILLIGER B, O'CALLAGHAN B, SIMON HU. Immunological effects of competitive versus recreational sports in cross-country skiing. *Int J Sports Med*. 2001; 22(1):52-9.
58. NORTON K, WHITTINGHAM N, CARTER L, KERR D, GORE C, MARFELL-JONES M. Técnicas de Medição em Antropometria. In: Norton K, Olds T, editors. *Antropometria. Artmed* 2005.
59. OLIVIERI, F. et al. The -174C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. *Experimental Gerontology*. 2002;37:309-14.
60. OZCAN A, DONAT H, GELECEK N, OZDIRENC M, KARADIBAK D. The relationship between risk factors for falling and the quality of life in older adults. *BMC*. 2005;5:90.
61. PAIXÃO JR. CM, REICHENHEIM ME. Uma revisão sobre instrumentos de avaliação do estado funcional do idoso. *Cad. Saúde Pub*. 2005;21(1):7-19.
62. PAWELEC, G., BARNETT, Y., FORSEY, R., FRASCA, D., GLOBERSON, A., MCLEOD, J., CARUSO, C., FRANCESCHI, C., FULOP, T., GUPTA, S., MARIANI, E., MOCCHEGIANI, E., SOLANA, R., T cells and aging. *Front Biosci* 2002; 7:1056-1183.
63. PENNIX, B. W. J. H. et al. Inflammatory Markers and Incident Mobility Limitation in the Elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2004;52(7):1105-13.
64. PERRIN, D.H. *Isokinetic exercise and assesment. United States of America, Ed. Human Kinetics Publishers, 1993. 212 p.*
65. PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2005;98:1154-62.
66. PODSIADLO D, RICHARDSON S. The Timed Up & Go: a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *Journal of the American Geriatrics Society* 1991;39:142-8.

67. POWRIE, F., M. W. Leach, *et al.* Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 1993; 5:1461-71.
68. REIS HJ, NICOLATO R, BARBOSA IG, TEIXEIRA DO PRADO PH, ROMANO-SILVA MA, TEIXEIRA AL. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2008;439(2):157-159.
69. RICHARDSON MT, LEON AS, JACOBS DR, AINSWORTH BE, SERFASS R. Comprehensive evaluation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire. *Journal Clinical Epidemiology* 1994;47(3):271-81.
70. ROUBENOFF, R. *et al.* Cytokines, Insulin-Like Growth Factor 1, Sarcopenia, and Mortality in Very Old Community-Dwelling Men and Women: The Framingham Heart Study. *American Journal of Medicine.* 2003;115(6):429-35.
71. SAKAGUCHI, S., N. SAKAGUCHI, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
72. SANDMAND M, BRUUNSGAARD H *et al.* Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 107-114.
73. SCHAAP, L. A. *et al.* Inflammatory Markers and Loss of Muscle Mass (Sarcopenia) and Strength. *The American Journal of Medicine.* 2006;119(6):526e9-526e17.
74. SCHÄBITZ WR, STEIGLEDER T, COOPER-KUHN CM, SCHWAB S, SOMMER C, SCHNEIDER A *et al.* Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke.* 2007;38(7):2165-2172.
75. SCHINDOWSKI K, BELARBI K, BUÉE L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav.* 2008;7(Suppl 1):43-56.
76. SCHULTE-HERBRÜGGEN O, NASSENSTEIN C, LOMMATZSCH M, QUARCOO D, RENZ H, BRAUN A. Tumor necrosis factor-alpha and

- interleukin-6 regulate secretion of brain-derived neurotrophic factor in human monocytes. *J Neuroimmunol*. 2005;160(1-2):204-209.
77. SHIMIZU, J., S. YAMAZAKI, *et al*. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3:135-42.
78. SHKURATOVA N, MORRIS ME, HUXHAM F. Effects of age on balance control during walking. *Arch Phys Med Rehabil*. 2004;85:582-8.
79. SHURIN GV, YURKOVETSKY ZR *et al*. Dynamic alteration of soluble biomarkers in healthy aging *Cytokine* 2007; 39: 123-129.
80. TAYLOR HL, JACOBS DR-J, SCHUCKER B, KNUDSEN J, LEON AS, DEBACKER G. Questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *Journal Chronic Disease* 1978;31:745-55.
81. TERRY, C. F. *et al*. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(24):18138-144.
82. TINETTI ME. Prevention of falls in elderly persons. *The New England Journal of Medicine* 2003;348(1):42-9.
83. TOTH MJ, MATTHEWS DE, TRACY RP, PREVIS MJ. Age-related differences in skeletal muscle protein synthesis: relation to markers of immune activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005 May;288(5):E883-91. Epub 2004 Dec 21.
84. VERAS R. Em busca de uma assistência adequada à saúde do idoso: revisão da literatura e aplicação de um instrumento de detecção precoce e de previsibilidade de agravos. *Cad. Saúde Pub*. 2003;19(3):705-15.
85. VISSER, M. *et al*. Muscle mass, muscle strength, and muscle fat infiltration as predictors of incident mobility limitations in well-functioning older persons. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2005;60A(3):324-33.
86. VISSER, M. *et al*. Relationship of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α With Muscle Mass and Muscle Strength in Elderly Men and Women: The Health ABC Study. *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*. 2002;57A(5):M326-M332.

87. WALSTON J, HADLEY E, FERRUCCI L, GURALNIK J, NEWMAN A, STUDENSKI A, WILLIAM B, ERSHLER M, HARRIS T AND FRIED LP. Research Agenda for Frailty in Older Adults: Toward a Better Understanding of Physiology and Etiology: Summary from the American Geriatrics Society/National Institute on Aging Research Conference on Frailty in Older Adults. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:991–1001.
88. WING, K., Z. FEHERVARI, *et al.* Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 2006; 18: 991-1000.
89. YASUTAKE C, KURODA K, YANAGAWA T, OKAMURA T, YONEDA H. Serum BDNF, TNF-alpha and IL-1beta levels in dementia patients: comparison between Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2006;256(7):402-406.
90. ZHONG, S. *et al.* Sarcopenia of ageing: functional, structural and biochemical alterations. *Revista Brasileira De Fisioterapia.* 2007;11(2):91-7.

Anexo 1

PROTOCOLO CLASSIFICAÇÃO FRAGILIDADE

Data: ____ / ____ / ____

Nome: _____

_____;

Endereço: Rua: _____ Nº: _____

Bairro: _____; CEP: _____; Cidade: _____

Telefones p/ contato: _____

Idade: ____ anos; Data de Nascimento: ____ / ____ / ____

Qual é o seu estado civil?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> 1. Casado/Vive com companheiro | <input type="checkbox"/> 3. Divorciado(a), separado(a) |
| <input type="checkbox"/> 2. Solteiro(a) | <input type="checkbox"/> 4. Viúvo(a) |

Qual a sua cor ou raça?:

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> 1. Branca | <input type="checkbox"/> 3. Mulata/cabocla/Parda |
| <input type="checkbox"/> 2. Preta/Negra | <input type="checkbox"/> 4. Amarela/Oriental |
| <input type="checkbox"/> 5. Indígena | |

Qual foi sua profissão durante a maior parte da vida adulta? _____

A sra é capaz de ler e escrever um bilhete simples? (se a pessoa responder que aprendeu a ler e escrever, mas esqueceu, ou que só é capaz de assinar o próprio nome, marcar não)

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 1. Sim | <input type="checkbox"/> 2. Não |
|---------------------------------|---------------------------------|

Até que ano da escola a sra estudou?

- | |
|---|
| <input type="checkbox"/> 1. Nunca foi a escola (nunca chegou a concluir a 1ª série primária ou curso de alfabetização de adultos) |
| <input type="checkbox"/> 2. Curso de alfabetização de adultos |
| <input type="checkbox"/> 3. Primário (atual nível fundamental – 1ª a 4ª série) |

- 4. Ginásio (atual nível fundamental – 5ª a 8ª série)
- 5. Científico, clássico, (atuais curso colegial ou normal, curso de magistério, curso técnico)
- 5. Curso Superior
- 6. Pós-graduação, com obtenção de título de Mestre ou Doutor

Quantos anos de escola? _____

A sra tem filhos?

- 1. Sim; Quantos? _____
- 2. Não

Quem mora com a sra?

- 1. Sozinho
- 2. Com o cônjuge ou companheiro
- 3. Com filhos ou enteados
- 4. Com netos
- 5. Com bisnetos
- 6. Com outros parentes
- 7. Com amigo(s)
- 8. Acompanhantes, cuidadores, empregada doméstica

SAÚDE FÍSICA PERCEBIDA

No último ano, algum médico já disse que a sra tem os seguintes problemas de saúde?

Doença do coração como angina, infarto do miocárdio ou ataque cardíaco?

- 1. Sim
- 2. Não

Pressão alta – hipertensão?

- 1. Sim
- 2. Não

Derrame / AVC / isquemia?

- 1. Sim
- 2. Não

Diabetes Mellitus?

- 1. Sim
- 2. Não

Tumor maligno / Câncer?

- 1. Sim
- 2. Não

Artrite ou reumatismo?

1. Sim 2. Não
Doença do pulmão (bronquite ou enfisema)?

1. Sim 2. Não
Depressão?

1. Sim 2. Não
Osteoporose?

1. Sim 2. Não
Incontinência Urinária?

1. Sim 2. Não
Doença de Parkinson?

1. Sim 2. Não
Labirintite?

1. Sim 2. Não

Doença vascular Periférica? (problema de circulação)

1. Sim 2. Não

USO DE MEDICAMENTOS

Quantos medicamentos a senhora tem usado de forma regular nos últimos 3 meses, receitados pelo médico ou por conta própria? _____

Quais os nomes da(s) medicação(ções) senhora usa? COLOCAR DOSAGENS

A senhora fuma?

1. Nunca fumou 3. Fuma. Há quanto tempo? _____
 2. Já fumou e largou

A senhora consome bebidas alcoólicas?

1. Nunca 4. 2 – 3 vezes por semana
 2. Uma vez por mês ou menos 4 ou mais vezes por semana
 3. 2 – 4 vezes por mês

MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

Agora faremos algumas medidas:

Peso	
Altura	
Circunferência Cintura	
Circunferência Quadril	

AVALIAÇÃO DA FORÇA MUSCULAR – Preensão Manual

Solicitarei ao Sr(a) que aperte bem forte a alça que o sr(a) está segurando

Membro dominante: () D () E

Medidas	MEMBRO DOMINANTE
1ª medida de força de preensão	
2ª medida de força de preensão	
3ª medida de força de preensão	

AVALIAÇÃO DA VELOCIDADE DE MARCHA

Agora pedirei que o Sr(a) ande no seu ritmo normal até a última marca no chão, ou seja, como se estivesse andando na rua para fazer uma compra na padaria. (Percurso = 4,8 m)

Tempo da velocidade _____ . _____ milésimos de segundos.

I - ESTADO MENTAL

Agora vou lhe fazer algumas perguntas que exigem atenção e um pouco da sua memória. Por favor, tente se concentrar para respondê-las.

QUESTÕES	RESPOSTAS	PONTUAÇÃO	
21 - Que dia é hoje?		(1) Certo (0) Errado	21 <input type="text"/>
22 - Em que mês estamos?		(1) Certo (0) Errado	22 <input type="text"/>
23 - Em que ano estamos?		(1) Certo (0) Errado	23 <input type="text"/>
24 - Em que dia da semana estamos?		(1) Certo (0) Errado	24 <input type="text"/>
25 - Que horas são agora aproximadamente? (considere correta a variação de mais ou menos uma hora)		(1) Certo (0) Errado	25 <input type="text"/>
26 - Em que local nós estamos? (dormitório, sala, apontando para o chão)		(1) Certo (0) Errado	26 <input type="text"/>
27 - Que local é este aqui? (apontando ao redor num sentido mais amplo para a casa)		(1) Certo (0) Errado	27 <input type="text"/>
28 - Em que bairro nós estamos ou qual o nome de uma rua próxima?		(1) Certo (0) Errado	28 <input type="text"/>
29 - Em que cidade nós estamos?		(1) Certo (0) Errado	29 <input type="text"/>
30 - Em que estado nós estamos?		(1) Certo (0) Errado	30 <input type="text"/>
31 - Vou dizer 3 palavras e o(a) senhor(a) irá repeti-las a seguir: CARRO – VASO – TIJOLO 32. Gostaria que o(a) senhor(a) me dissesse quanto é: (se houver erro, corrija e prossiga. Considere correto se o examinado espontaneamente se corrigir)	31. a - CARRO	(1) Certo (0) Errado	31.a <input type="text"/>
	31. b - VASO	(1) Certo (0) Errado	31.b <input type="text"/>
	31. c - TIJOLO	(1) Certo (0) Errado	31.c <input type="text"/>
32 - Gostaria que o(a) senhor(a) me dissesse quanto é: (se houver erro, corrija e prossiga. Considere correto se o examinado espontaneamente se corrigir)	32. a - 100 - 7 _____	(1) Certo (0) Errado	32.a <input type="text"/>
	32. b - 93 - 7 _____	(1) Certo (0) Errado	32.b <input type="text"/>
	32. c - 86 - 7 _____	(1) Certo (0) Errado	32.c <input type="text"/>
	32. d - 79 - 7 _____	(1) Certo (0) Errado	32.d <input type="text"/>
	32. e - 72 - 7 _____	(1) Certo (0) Errado	32.e <input type="text"/>

QUESTÕES	RESPOSTAS	PONTUAÇÃO
33 - O(a) senhor(a) consegue se lembrar das 3 palavras que lhe pedi que repetisse agora há pouco?	33. a - CARRO	(1) Certo 33.a <input type="text"/> (0) Errado
	33. b - VASO	(1) Certo 33.a <input type="text"/> (0) Errado
	33. c - TIJOLO	(1) Certo 33.a <input type="text"/> (0) Errado
34 - Mostre um relógio e peça ao entrevistado que diga o nome.		(1) Certo 34 <input type="text"/> (0) Errado
35 - Mostre uma caneta e peça ao entrevistado que diga o nome.		(1) Certo 35 <input type="text"/> (0) Errado
36 - Preste atenção: vou lhe dizer uma frase e quero que repita depois de mim: NEM AQUI, NEM ALI, NEM LÁ. (Considere somente se a repetição for perfeita)		(1) Certo 36 <input type="text"/> (0) Errado
37 - Agora pegue este papel com a mão direita. Dobre-o ao meio e coloque-o no chão. (Falar todos os comandos de uma vez só)	37.a - Pega a folha com a mão correta	(1) Certo 37.a <input type="text"/> (0) Errado
	37.b - Dobra corretamente	(1) Certo 37.b <input type="text"/> (0) Errado
	37.c - Coloca no chão	(1) Certo 37.c <input type="text"/> (0) Errado
38. Vou lhe mostrar uma folha onde está escrito uma frase. Gostaria que fizesse o que está escrito: FECHE OS OLHOS		(1) Certo 38 <input type="text"/> (0) Errado
39. Gostaria que o(a) senhor(a) escrevesse uma frase de sua escolha, qualquer uma, não precisa ser grande		(1) Certo 39 <input type="text"/> (0) Errado
40. Vou lhe mostrar um desenho e gostaria que o(a) senhor(a) copiasse, tentando fazer o melhor possível. Desenhar no verso da folha. (Considere apenas se houver 2 pentágonos interseccionados, 10 ângulos, formando uma figura com 4 lados ou com 2 ângulos)		(1) Certo 40 <input type="text"/> (0) Errado
Score Total		<input type="text" value="41"/> <input type="text"/>

ALTERAÇÕES NO PESO

O Sr(a) perdeu peso, de forma não intencional/involuntária (sem fazer dieta ou regime) no último ano? Quantos quilos aproximadamente? O sr(a) perdeu mais de 4,5 Kg de seu peso involuntariamente, considerando seu peso no ano anterior?

1. Sim () Quantos quilos? _____
 2. Não ()
 99. Não sabe dizer ()

ATIVIDADE FÍSICA

O(a) Sr(a) realiza alguma atividade física de forma regular?

1. Hidroginástica 1x () 2x () 3x ()
 2. Caminhada 1x () 2x () 3x ()
 3. Exercícios em clubes/academias/igreja, etc 1x () 2x () 3x ()
 4. Outros: _____ 1x () 2x () 3x ()

Questionário Minnesota de Atividades Físicas de Lazer

A ser completado pelo participante		Você realizou esta atividade ?		Quantas vezes você fez essa atividade nas últimas duas semanas?		Tempo por ocasião	
Atividade (1)		Nã o	Si m	H	Min		
Seção A: Caminhada							
010	Caminhada recreativa						
020	Caminhada para o trabalho <i>(continua por 10 min ou +)</i>						
030	Uso de escadas quando o elevador está disponível <i>(não contar descidas; 1 lance = 1 andar)</i>						
040	Caminhada no campo						
050	Caminhada com mochila						
060	Alpinismo / escalando montanhas						
115	Ciclismo recreativo/ pedalando por prazer						
125	Dança – salão, quadrilha, e/ou discoteca, danças regionais						
135	Dança – aeróbia, balé						
140	Hipismo/ andando a cavalo						
Seção B: Exercício de Condicionamento							
150	Exercícios domiciliares (quais?)						
160	Exercício em clube/ em academia						
180	Combinação de caminhada/corrída leve						
200	Corrida						
210	Musculação						
Seção C: Atividades Aquáticas							
220	Esqui aquático						
235	Velejando em competição						

250	Canoagem ou remo recreativo		
260	Canoagem ou remo em competição		
270	Canoagem em viagem de acampamento		
280	Natação em piscina (pelo menos 15 metros)		
295	Natação na praia		
310	Mergulho Autônomo		
320	Mergulho Livre - snorkel		

Seção D: Atividades de Inverno

340	Esquiar na montanha		
350	Esquiar no plano		
360	Patinação no gelo ou sobre rodas		
370	Trenó ou Tobogã		

Seção E: Esportes

390	Boliche		
400	Voleibol		
410	Tênis de mesa		
420	Tênis individual		
430	Tênis de duplas		
440	Softball		
450	Badminton		
460	Paddleball		
470	Racquetball		

A ser completado pelo participante	Você realizou esta atividade ?
Atividade (1)	

Quantas vezes você fez essa atividade nas últimas duas semanas?	Tempo por ocasião	
	H	Min

Seção E: Esportes (continuação)Nã Si
o m

480	Basquete, sem jogo (bola ao cesto)		
490	Jogo de basquete		
500	Basquete, como juiz		
510	Futebol Americano		
520	Handebol		
530	<i>Squash</i>		
540	Futebol		

Golf

070	Dirigir carro de golfe		
080	Caminhada, tirando os tacos do carro		
090	Caminhada carregando os tacos		

Seção F: Atividades no jardim e horta

550	Cortar a grama dirigindo um carro de cortar grama		
560	Cortar a grama andando atrás do cortador de grama motorizado		
570	Cortar a grama empurrando o cortador de grama manual		
580	Tirando o mato e cultivando o jardim		
590	Afofar, cavando e cultivando a terra no jardim e horta		
600	Trabalho com ancinho na grama		
610	Remoção de neve/terra com a pá		

Seção G: Atividades de reparos domésticos

620	Carpintaria em oficina		
-----	------------------------	--	--

--	--	--	--

630	Pintura interna de casa ou colocação de papel de parede				
640	Carpintaria do lado de fora da casa				
650	Pintura exterior de casa				

Seção H: Caça e Pesca

660	Pesca na margem do rio				
670	Pesca em correnteza com botas				
680	Caça a faisão ou galo-silvestre				
690	Caça a coelho, esquilo, guaxinis				
710	Caça a animais de grande porte				

Seção I: Outras Atividades

	Caminhar como exercício /Caminhada rápida				
	Tarefas domésticas de moderadas a intensas				
	Exercícios em bicicleta ergométrica				
	Exercícios calistênicos				
	Corrida leve				
	Surfe				

ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA

Questões	não	sim
1. Você está basicamente satisfeito com sua vida?	1	0
2. Você deixou muitos de seus interesses e atividades?	0	1
3. Você sente que sua vida está vazia?	0	1
4. Você se aborrece com frequência?	0	1
5. Você se sente de bom humor a maior parte do tempo?	1	0
6. Você tem medo que algum mal vá lhe acontecer?	0	1
7. Você se sente feliz a maior parte do tempo?	1	0
8. Você sente que sua situação não tem saída?	0	1
9. Você prefere ficar em casa a sair e fazer coisas novas?	0	1
10. Você se sente com mais problemas de memória do que a maioria?	0	1
11. Você acha maravilhoso estar vivo?	1	0
12. Você se sente um inútil nas atuais circunstâncias?	0	1
13. Você se sente cheio de energia?	1	0
14. Você acha que sua situação é sem esperanças?	0	1
15. Você sente que a maioria das pessoas está melhor que você?	0	1

Anexo 2

CARTA DE INFORMAÇÃO AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Título da pesquisa: **INFLUÊNCIA DA INTERVENÇÃO FISIOTERÁPICA, EM IDOSAS COM SÍNDROME DE FRAGILIDADE SOBRE AS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS.**

Pesquisador: Profa. Dra. Leani Souza Máximo Pereira.

Aluna de doutorado: Fernanda Matos Coelho

Instituição: Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG-Departamento de Fisioterapia.

JUSTIFICATIVA:

A população brasileira vem envelhecendo de forma bastante rápida no ano de 2020 a população brasileira de idosos será muito grande. Frequentemente, o envelhecimento está associado as doenças e incapacidades que causam alterações na qualidade de vida dos idosos.

Estudos anteriores, mostram que marcadores biológicos podem ser preditivos de diminuição de força muscular e piora da capacidade funcional em idosos.

Alguns tipos celulares secretam uma série de proteínas sinalizadoras denominadas de citocinas que atuam como mediadores locais, participando desta maneira da resposta inflamatória.

A prática de exercícios físicos de maneira adequada causam benefícios para a saúde global de todos os indivíduos em todas as faixas etárias.

Esperamos com esse trabalho tentar caracterizar idosas de uma região brasileira quanto aos critérios de fragilidade, o desempenho em termos muscular, funcional e imunológico com testes e procedimentos específicos.

Verificaremos também qual o impacto de um programa de exercícios físicos nas variáveis pesquisadas.

Dessa forma, poderemos entender melhor essas associações dessas variáveis e propor o desenvolvimento de ações preventivas e de tratamento para a melhoria da qualidade de vida dos idosos.

Esperamos também contribuir desta forma, para a formação de conhecimento em geriatria e gerontologia no Brasil, contribuindo indiretamente para o desenvolvimento de novas políticas de saúde.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Verificar se existe diferença nos níveis de mediadores inflamatórios denominados: células T regulatórias e de algumas proteínas reguladoras denominadas citocinas antes e após intervenção fisioterápica em idosas da comunidade pré frágeis e frágeis.

INFORMAÇÕES SOBRE A COLETA DO SANGUE E TESTES A SEREM REALIZADOS:

Serei submetida ao teste de avaliação cognitiva – Mini-exame do estado mental, antes assinar qualquer documento. Se o meu desempenho no teste for abaixo

dos pontos de corte previstos por Bertolucci em 1994, serei excluída dos procedimentos do estudo.

Responderei a um questionário com dados sócio-demográficos e estado de saúde, contendo perguntas acerca do meu estado clínico atual, e, caso haja alguma doença aguda instável no momento da entrevista ou as medicações de que faço uso sejam as inclusas nos critérios de exclusão, também estou de acordo em não participar como sujeito desta pesquisa.

Fui informada que serei submetida a uma coleta de 10 ml de sangue periférico, que será retirado da veia mediana ulnar do braço direito por um profissional qualificado observando todas as normas de proteção e segurança com material corto-perfurante (agulhas e seringas descartáveis, em ambiente estéril). Todo esse procedimento será realizado em ambiente esteril observando todas as normas do uso adequado e assepsia do material perfuro cortante. Esse procedimento será realizado no Laboratório de Dor e Inflamação do Depto. de Ed. Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.

O pesquisador responsável arcará com as despesas do transporte para esse local.

Fui esclarecido que a coleta do volume de sangue (10ml); não acarretará nenhum risco para a minha saúde. O dolorimento no local onde é retirado o sangue em alguns casos pode ocorrer, mas desaparece rapidamente.

Fui esclarecido também que participarei gratuitamente, de sessões de exercícios físicos 3 vezes por semana. Os exercícios serão prescritos e supervisionados por profissionais qualificados. Todos os cuidados na aplicação dos mesmos serão observados.

Fui informada que poderei fazer perguntas ou solicitar informações atualizadas sobre o estudo em qualquer momento do mesmo.

Caso não deseje participar do estudo terei a liberdade de me retirar em qualquer momento do mesmo.

Se houver algum prejuízo para a minha saúde, comprovadamente causadas pelos procedimentos descritos acima, terei a meu dispor tratamento médico e indenização financeira por parte da Instituição.

Caso venha a desenvolver alguma reação adversa relacionados ao estudo ou tenha dúvidas sobre o referido estudo, por favor ligue para Fernanda Coelho nos telefones 9805-1038 / 3283-1667 para Dra Leani Souza Máximo Pereira, 031-99522878; 34994783.

Em caso de perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo o Comitê de ética e Pesquisa da UFMG também poderá ser contactado pelo telefone (031) 3499-4592 /3499-4516

Recebi as informações acima e as compreendo completamente. Estou participando dessa pesquisa e fui informada que os resultados individuais da mesma são confidenciais e não serão divulgados. Concordo com a divulgação

dos resultados finais, caracterizando o grupo de indivíduos, após o devido tratamento estatístico.

_____/_____/_____

Data

Assinatura do participante

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____,

conforme assinatura abaixo, concordo em participar, de livre e espontânea vontade, da pesquisa intitulada: **INFLUÊNCIA DA INTERVENÇÃO FISIOTERÁPICA, EM IDOSAS COM SÍNDROME DE FRAGILIDADE SOBRE AS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS.**

Tenho conhecimento dos objetivos e da metodologia a ser empregada e de todos os procedimentos, através da carta de esclarecimento lida para os participantes antes do início do estudo, em anexo.

Fui informada, que serei submetida a uma coleta de 10 ml de sangue periférico, que será retirado da veia mediana ulnar do braço direito por profissional da área de saúde (enfermeiro) devidamente capacitado para tal.

Nenhum dos procedimentos oferece risco para a minha saúde.

Quando julgar necessário e sem qualquer prejuízo para minha parte, poderei cancelar o presente termo de consentimento.

_____/_____/_____

Data

Assinatura do participante

Mini-currículo

Fernanda Matos Coelho

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome: Fernanda Matos Coelho

Nome em citações bibliográficas: Coelho, F M

Nascimento: 07/09/1981

CPF: 053428836-79

Formação acadêmica/ Titulação

2008

Doutorado em andamento em Ciências da Reabilitação (Conceito CAPES 5) .

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

Título: Impacto de uma Intervenção fisioterápica em idosas com síndrome de fragilidade sobre as células T regulatórias, a produção de citocinas e fatores neurotróficos.

Orientador: Leani Souza Máximo Pereira.

2006 - 2007

Mestrado em Biologia Celular (Conceito CAPES 5) .

Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

Título: Efeito do antagonista do receptor CXCR2 repertaxina, na resposta inflamatória em modelo experimental de artrite, Ano de Obtenção: 2007.

Orientador: Antônio Lúcio Teixeira Júnior.

Co-Orientadora: Vanessa Pinho

Palavras-chave: Artrite induzida por antígeno; Quimiocinas; Receptor CXCR2.

2006 - 2007

Especialização em Fisioterapia Aquática .

Universidade Cidade de São Paulo, UNICID, Brasil.

Título: Atividade do músculo deltóide em imersão durante a adução horizontal e com palmar feedback-estudo de caso.

Orientador: Fábio Navarro Cyrillo.

2000 - 2005

Graduação em Fisioterapia.

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, PUC Minas, Brasil.

Produção Bibliográfica (artigos completos publicados em periódicos)

1) **COELHO, F.M.**, Narciso FM, Oliveira DM, Pereira DS, Teixeira AL, Teixeira MM, Souza DG, Pereira LS. sTNFR-1 is an early inflammatory marker in community versus institutionalized elderly women. *Inflamm Res*. 2009 Aug 22. [Epub ahead of print]

2) Souza, D. G. ; Amaral, F. A. ; Fagundes, C. T. ; **COELHO, F. M.** ; Arantes, R. M.E. ; Sousa, L. P. ; Matzuk, M. M. ; Garlanda, C. ; Mantovani, A. ; Dias, A. A. ; Teixeira, M. M. . The Long Pentraxin PTX3 Is Crucial for Tissue Inflammation after Intestinal Ischemia and Reperfusion in Mice. *The American Journal of Pathology (Print)*, v. 174, p. 1309-1318, 2009.

3) Leani Souza Máximo Pereira ; Fabrícia Mendes Silva Narciso ; Daniela Matos Garcia Oliveira ; **COELHO, F. M.** ; Danielle G. Souza ; Rosângela Corrêa Dias . Correlation between manual muscle strength and interleukin-6 (IL-6) plasma levels in elderly community-dwelling women.. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 46, p. 401, 2008.

4) Cunha TM ; Barsante MM ; Guerrero AT ; Verri WA ; Ferreira SH ; **COELHO, F. M.** ; Bertini R ; Giacinto C Di ; Allegretti M ; Cunha FQ ; Teixeira MM . Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice.. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, p. 460-470, 2008.

5) **COELHO, F. M.** ; Vanessa S. Pinho ; Amaral, F. A. ; Costa, V.V. ; Danielle G. Souza ; Bertini R ; Antônio L. Teixeira ; Mauro Martins Teixeira . The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, p. 2329-2337, 2008.

6) Deruaz, M. ; Frauenschuh, A. ; Alessandri, A. L. ; Dias, J. M. ; **COELHO, F. M.** ; Russo, R. C. ; Ferreira, B. R. ; Graham, G. J. ; Shaw, J. P. ; Wells, T. N.C. ; Teixeira, M. M. ; Power, C. A. ; Proudfoot, A. E.I. . Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *Journal of Experimental Medicine*, v. 205, p. 2019-2031, 2008.

7) Antônio L. Teixeira ; **COELHO, F. M.** ; Mauro Martins Teixeira . All-or-Nothing Type Biphasic

Cytokine Production of Human Lymphocytes After Exposure to Alzheimer's β -Amyloid Peptide. *Biological Psychiatry*, p. 140, 2008.

8) COELHO, F. M. ; Mauro M. Teixeira ; Antônio L. Teixeira . Increased serum levels of inflammatory markers in chronic institutionalized patients with schizophrenia.. *Neuroimmunomodulation (Basel)*, v. 15, p. 140-144, 2008.

9) FERREIRA, C ; PEREIRA, A ; AMARAL, F ; DESOUZA, R ; **COELHO, F. M.**; _SOUZA, D ; NEGRAOCORREA, D ; TEIXEIRA, M ; COELHO, F. M. . Mechanisms of the airway hyperresponsiveness induced by *Strongyloides venezuelensis* infection in rats: Role of capsaicin-sensitive neurons. *Microbes and Infection*, p. 1, 2008.

10) Oliveira, D.M.G. ; Narciso, F.M.S. ; Santos, M.L.A.S. ; Pereira, D.S. ; **COELHO, F.M.** ; Dias, J.M.D. ; Pereira, L.S.M. . Muscle strength but not functional capacity is associated with plasma interleukin-6 levels of community-dwelling elderly women. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 1148, 2008.

11) COELHO, F. M. ; Andréa C. Pessini ; Amanda M. Coelho ; Vanessa S. Pinho; Danielle G. Souza ; Eliane C. Arantes ; Mauro M. Teixeira ; Antônio L. Teixeira . Platelet activating factor receptors drive CXC chemokine production, neutrophil influx and edema formation in the lungs of mice injected with *Tityus serrulatus* venom.. *Toxicon*, v. 50, p. 420-427, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)