



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA**



Perfil imunológico e composição da microbiota como biomarcadores do envelhecimento saudável.

GABRIELA SILVEIRA NUNES ABREU

**BELO HORIZONTE
AGOSTO DE 2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA**



Perfil imunológico e composição da microbiota como biomarcadores do envelhecimento saudável.

Tese apresentada à comissão examinadora indicada pelo curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

GABRIELA SILVEIRA NUNES ABREU

Orientadora: Ana Maria Caetano de Faria - UFMG

Co-orientador: Olindo Assis Martins Filho – FIOCRUZ - MG

**BELO HORIZONTE
AGOSTO DE 2016**

EXECUÇÃO DO TRABALHO

Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG

Laboratório de Pesquisa em Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), Governador Valadares, MG.

Laboratório de Biomarcadores, Diagnóstico e Monitoração – LBDM, Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR / FIOCRUZ

COLABORADORES:

Universidade Federal de Minas Gerais Centro de Pesquisas René Rachou

Dr^a Andrea Gazzinelli

Dr Cassio Turra

Dra Danielle Fernandes Durso

Dr Olindo Assis Martins Filho

Dr^a Andréa Teixeira de Carvalho

Dr^o Rodrigo Corrêa de Oliveira

Dr^a Elaine Speziali de Faria

Dra Karen Cecília de Lima Torres

Università di Bologna (Itália)

Dr Claudio Franceschi

Dra Patrizia Brigidi

Dra Silvia Turrone

Dr Simone Rampelli

Universidade Vale do Rio Doce (Governador Valadares, MG)

Dr^a Lúcia Alves Oliveira Fraga

Dra Alda Maria Soares Silveira

Maria de Fátima da Silva

Marlucy Rodrigues Lima

Lilia Cardoso Pires

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG (Projeto PPSUS 2013)

Centro de Pesquisas René Rachou – CPqRR / FIOCRUZ

Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE

Università di Bologna (Bologna, Itália)

Fundação Oswaldo Cruz/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FIOCRUZ/CNPq (PAPES IV)

Em um estudo onde li tanto sobre centenários, e aprendi a beleza de ser professora não poderia deixar de dedicá-lo **à minha avó Stael** que viveu 102 anos de gentileza, ternura, carinho e ensinamentos a todos que a cercavam. Agradeço por tudo que seu amor e seus ensinamentos fizeram por minha vida.

Recito, então, as nossas palavras, pra sempre nossas...

*"Seguida da vovó, meiga e bonita,
ela entra numa loja de armarinho.
_Tem fita de cetim azul marinho?
Qual o preço?_perguntou ela catita.*

*_Um beijo cada metro, senhorita,
_Ahhh tá muito caro, mas corte-me cinco metros desta fita!*

*O caixeiro, como um raio,
cortava a fita quase num desmaio,
sem ter sequer da tesourinha dó.*

*_Pronto, senhorita, e o pagamento agora?
E a moça lhe responde sem demora,
_Adeus! Quem paga a conta é a vovó"*

Até logo, Vovó, espero, saudosa, o dia em que nos encontraremos junto ao Pai.

AGRADECIMENTOS

A realização dessa tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se tornaria realidade e pelos quais sou eternamente grata.

À minha orientadora Dra. Ana Maria Caetano de Faria, somente posso reconhecer o prazer e a inspiração que foi trabalhar ao seu lado. Entrego-lhe, Ana, neste momento, todo meu carinho, respeito e admiração. Muito obrigada por acreditar na cientista que existe em mim muitas vezes mais que eu mesma. Nesse mundo, em que muitas vezes estamos cercados de vaidade e escuridão, você foi o farol que guiou meu caminho tantas vezes errante. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Dr. Olindo Assis Martins Filho, que foi sempre aquele que acreditou em mim, me fez mestre, e agora me faz doutora. Considero-o um padrinho. Foi aquele que me deu a mão e me ajudou a atravessar (mais de uma vez) encarar com bravura a tempestade que muitas vezes enfrentamos na ciência. Espero, Olindo, levar comigo tudo que me ensinou e poder ainda e sempre continuar aprendendo.

Aos meus pais, Marilene e Roberto, pelo amor, incentivo e apoio incondicionais. Obrigada pela amizade e paciência durante todos os momentos dessa jornada e especialmente por todas as vezes que entenderam as minhas ausências. Obrigada por me ensinar a ter fé em Deus e em mim. Sem dúvida alguma essa conquista é nossa. MUITO OBRIGADA por sempre acreditarem em mim.

Às minhas irmãs, Tainá e Jéssica, que são meu ser fora do meu corpo. Obrigada por sempre estiverem presentes. Não cansarei de repetir que vocês sempre serão o pilar em que sustento minha vida. O amor, carinho e alegria de vocês foram a força para os momentos de desânimo e fraqueza.

Ao meu amado marido, Henrique, dedico toda conquista, todo esforço, e todo amor que tenho em meu coração. Quando tudo era vazio, você me mostrou o caminho, me fez sorrir. Obrigada por existir na minha vida, e pela imensa paciência que teve comigo todo esse tempo. E enfim, obrigada por me fazer tão feliz

Aos meus irmãos Roberto Filho e Raphael pelos momentos divertidos que vivemos que aliviaram tempos de angustia e por me amarem cada um a sua maneira.

Aos meus sobrinhos, Arthur, Caio, Ana Clara e Miguel, aos meus afilhados João Victor e Alexandre, obrigada por serem meus presentes de Deus, por entenderem minha ausência e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor. Vocês são o alicerce do meu encanto pela vida!

Às minhas cunhadas Clarissa e Theresa, minha sogra Suely, meu sogro Luiz Lobo e sua esposa Diva e a toda família Vaz de Abreu que me aceitaram como seus e que agora são para sempre moradores do meu coração.

Aos cunhados Igor e Agnelo, Ana e Cris pela alegria que é estar ao lado de vocês, por cuidarem dos meus irmãos os amarem e abraçarem nossa família como de vocês!

Aos meus Vó Natalia e Vô Zezé, agradeço pelo amor, orações e imenso carinho. Vocês também foram fundamentais para minha educação.

Aos amores eternamente em meu coração, Vó Stael, Vô Oseias e Tio Eunápio, que agora olham por mim junto ao Pai, nenhum tempo teria sido suficiente (in memoriam).

Aos tios e primos, pelo apoio, compreensão e por fazerem dos nossos encontros momentos felizes e inesquecíveis.

Aos meus grandes amigos da vida Rosária, Bárbara, Talita, Sinnara e Luiz por serem os “anjos” que Deus me enviou para cuidar de mim.

Aos meus amigos do LIB, por compartilhar conhecimento e alegria todos os dias. Saibam que "aqueles que passam por nós, não vão sós e não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós" (Saint-Exupéry). Levarei um pouco de cada um de vocês em meu coração aonde quer que eu vá!

Aos amigos do LBDM, Elaine, Lorena, Amanda, Jucélia, Jordana e tantos outros que contribuíram para meu trabalho, obrigada por fornecerem toda ajuda que precisei. Com vocês, muito mais que conhecimento científico, fiz amizades para a vida toda!

A Dra Andréa Teixeira, pelo apoio durante toda minha formação como cientista, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei e pelo exemplo de competência, disciplina e gentileza incontestavelmente contribuíram aos meus anos de pesquisa.

Aos amigos de Bologna, em especial Ítalo e Danielle, por tornarem minha estadia italiana muito mais leve e feliz.

Aos companheiros do Laboratorio di Microbiologia da Università di Bologna, em especial à Dra Patrizia Brigidi e Dra Silvia Turroni, obrigada pelo apoio na execução das análises de microbiota e pelo conhecimento adquirido. Grazie Mille.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG por contribuírem com seu conhecimento para minha construção pessoal e profissional.

À Casa Unimed e todos profissionais envolvidos nas coletas, obrigada por permitir a realização desse trabalho, por acreditar em nosso projeto e por facilitar nosso trabalho.

Aos pacientes estudados neste trabalho pela oportunidade de aprendizado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Enfim, agradeço a Deus por Sua proteção, Sua providência, por todas as alegrias e dificuldades com as quais amadureci. Agradeço por minha família e por todas as pessoas que compartilharam momentos de suas vidas comigo, com palavras, olhares, gestos e ensinamentos. Minha vida e meu trabalho são fruto do Amor de Deus por mim e a Ele dedico toda minha existência.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

“O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muito nos aproxima.”

Louis Pasteur

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xviii
INTRODUÇÃO	1
<i>PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: PONTO DE VISTA IMUNOLÓGICO</i>	4
<i>MICROBIOTA, INFLAMAÇÃO E SAÚDE</i>	9
<i>HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E INFLAMAÇÃO</i>	12
JUSTIFICATIVA.....	14
OBJETIVO GERAL:	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MÉTODOS:	18
POPULAÇÃO DE ESTUDO	18
EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES	23
Avaliação da produção intracitoplasmática de citocinas em subtipos de leucócitos do sangue periférico.....	23
Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periféricas (PBMC).....	31
Análises de produção de citocinas.....	34
Análise da microbiota bacteriana nas fezes.....	38
RESULTADOS	43
Variacões na produção de citocinas por subtipos de leucócitos ao longo da vida	43
Perfil imunológico de indivíduos com alta frequência de células da imunidade inata e adaptativa produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras	51
Impacto da presença de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) no perfil imunológico e na composição da microbiota intestinal e.	57

Indivíduos hipertensos apresentam um perfil inflamatório de citocinas	58
Análise da composição da microbiota intestinal em indivíduos hipertensos.....	64
A diversidade da microbiota intestinal estava alterada em indivíduos hipertensos.	65
Indivíduos hipertensos apresentaram uma microbiota intestinal em disbiose	67
Indivíduos hipertensos apresentaram composição microbiana distinta no nível de família e gênero.....	69
A disbiose da microbiota em indivíduos hipertensos ocorreu independentemente da idade e da dieta consumida	71
DISCUSSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO 1.....	116
ANEXO 2.....	118
ANEXO 3.....	129
ANEXO 4.....	135
ANEXO 5.....	137

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Categorias de saúde e do processo de fragilização do idoso de acordo com sua capacidade funcional (graus de dependência e perda de autonomia), Moraes (2016).....	22
Figura 2: Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.....	27
Figura 3: Perfil de análise de monócitos.....	28
Figura 4: Perfil de análise de neutrófilos.....	30
Figura 5: Perfil de indivíduos com alta frequência de neutrófilos, monócitos e células <i>natural killer</i> (NK) produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras.....	47
Figura 6: Perfil de indivíduos com alta frequência células T CD4+, células T CD8+ e células B produtoras de citocinas pró-inflamatória e reguladoras.....	49
Figura 7: Gráfico em radar representa o balanço nos indivíduos entre a alta frequência de células produtoras de citocinas inflamatórias (■) ou reguladoras (■) nos compartimentos da imunidade inata e adaptativa.....	53
Figura 8: Assinatura de altas frequências de células produtoras de citocinas nos compartimentos imune inata e adaptativa em faixas etárias.....	55
Figura 9: Comparação de produção de citocinas em sobrenadante de PBMC, dosada por citometria de fluxo, entre os grupos Hipertenso (HAS) e Normotenso (Controle)...	61
Figura 10: Assinatura de citocinas produzidas por PMBC de indivíduos Hipertensos e Normotensos.....	62
Figura 11: Score inflamatório em relação a Hipertensão Arterial Sistêmica.....	64

Figura 12: Comparação da estrutura microbiana intestinal entre indivíduos hipertensos e normotensos.....	66
Figure 13: Composição da microbiota intestinal ao nível de filos em indivíduos hipertensos (HAS) e normotensos (Controle).....	68
Figura 14: Análise de Coordenadas Principais das distâncias <i>UniFrac</i> ponderadas (<i>Weighted</i>) para indivíduos hipertensos e normotensos.....	70
Figura 15: Comparação da abundância relativa da família Lachnospiraceae e de grupos microbianos pertencentes a essa família: Coprococcus e Roseburia.....	71
Figura 16: Quantidade calculada de fibras consumidas por indivíduos normotensos e hipertensos.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mediana global da frequência de células produtoras de citocinas do universo de dados de citocinas produzidas por leucócitos.....	35
Tabela 2: Dados demográficos e de saúde dos indivíduos da Casa UNIMED em Governador Valadares, categorizados pela presença de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS).....	58
Tabela 3: Composição da microbiota intestinal ao nível de Filos em indivíduos hipertensos (HAS) e normotensos (Controle).....	67
Tabela 4: Percentagem de macronutrientes ingeridos por indivíduos dos grupos hipertenso (HAS) e do grupo normotenso (controle).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

16S – Subunidade 16 do ribossomo

BD - Becton Dickinson

CBA - Cytometric Bead Array, ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes

CD – Cluster de diferenciação

CFA – do inglês, complete freund's adjuvante

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DP - desvio padrão

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

et al - do latim, significa colaboradores

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

FL2 - Canal de detecção da fluorescência laranja, classificada como fluorescência do tipo 2 nos ensaios de citometria de fluxo

Foxp3- forkhead box P3, Fator de transcrição associado a regulação imune

FSC - forward scatter

FSC - Sigla para parâmetro de tamanho celular em ensaios de citometria

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HLA-DR- Human Leukocyte Antigen - antigen D Related

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN - Interferon

IL - Interleucina

KO - Knockout

LAP - latency associated peptide

LAP - Latency-associated peptide

MFF - Max Facs Fix, solução fixadora de células para ensaios de citometria

MHC - do inglês, Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Microlitro

mm - Milímetro

NK – Natural Killers

OMS - Organização Mundial de Saúde
OTU - Operational Taxonomic Units
PBMC - do inglês, “Peripheral Blood Mononuclear Cells”, ou seja, células mononucleadas do sangue periférico
PBS - do inglês, “Phosphated Buffer Solution”, ou seja, solução tampão salínico fosfatado
PCoA - Principal Coordinates Analysis
PCR – Proteína C Reativa
PCR –Reação em cadeia da polimerase
PE - Ficoeritrina, substância que emite fluorescência no comprimento de onda do espectro laranja da luz visível
pg/mL - Picogramas (10^{-9} grama) por mililitro
pH - potencial hidrogeniônico
RPMI 1640 - Solução nutritiva para cultivo
rRNA – ácido ribonucleico ribossomal
SCFA – do inglês, ácidos graxos de cadeia curta
SSC - side scatter
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF - Transforming growth factor
TLR – do inglês, Receptores do tipo Toll
TNF- Fator de necrose tumoral
Unimed - cooperativa de trabalho médico
UNIVALE - Universidade Vale do Rio Doce
WHO - do inglês, Organização Mundial de Saúde
x g - Aceleração da gravidade (giros por minuto)

RESUMO

O envelhecimento é um fenômeno complexo caracterizado por alterações nos sistemas fisiológicos do corpo e que está associada a mudanças no fenótipo e repertório de ativação de leucócitos, assim como no perfil das citocinas produzidas por essas células. A alteração cumulativa na rede de citocinas é responsável por um estado pró-inflamatório crônico conhecido como "inflammaging". Esse estado de inflamação crônica tem sido descrito como uma combinação de disfunções imunológicas, que se não reguladas, resulta em fragilidade e morbidade na população idosa. Vários mecanismos, como a inflamação e a composição alterada da microbiota, são comuns ao envelhecimento biológico e ao desenvolvimento de algumas condições patológicas associadas ao envelhecimento como a hipertensão arterial sistêmica. Eles parecem ter papel chave no desenvolvimento dos riscos cardiovasculares e de hipertensão em idosos. O impacto das alterações relacionadas à idade no perfil global de citocinas de indivíduos brasileiros saudáveis em várias faixas etárias (0-85 anos) (população 1) foram caracterizados utilizando culturas de células do sangue total e análise das células por citometria de fluxo. A contribuição das células da imunidade (neutrófilos e células NK) para a perfil global de citocinas foi particularmente importante em recém-nascidos e idosos. Os adultos apresentaram um perfil equilibrado de citocinas com contribuições equivalentes dos compartimentos da imunidade inata e da adaptativa e de ambas as categorias de citocinas (inflamatórias e reguladoras). Dentre os indivíduos selecionados como saudáveis, categorizamos aqueles que apresentavam hipertensão arterial relatada e avaliamos o perfil de citocinas produzidas por leucócitos do sangue além da composição da microbiota intestinal desses indivíduos. Foram coletadas amostras de 80 indivíduos brasileiros com idade entre 26 a 87 anos (população 2). Quando analisadas as concentrações das citocinas IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 em sobrenadantes de cultura de PBMC, o grupo hipertenso mostrou uma maior proporção de TNF/IFN- γ e um perfil mais inflamado em comparação ao grupo de controle. Essas alterações foram acompanhadas, no grupo Hipertenso, por uma redução da diversidade da microbiota (analisada por sequenciamento Illumina de alto rendimento do rRNA 16S). A disbiose observada nesse grupo foi caracteriza por elevação da razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), contração da população de Bacteroidetes e dos conhecidos produtores de butirato da família Lachnospiraceae, Roseburia, Coprococcus. Nossos resultados apoiam a hipótese de que o envelhecimento não está necessariamente associado a um declínio progressivo na produção de citocinas por

todos os subtipos de leucócitos, mas caracterizado por distintas flutuações de citocinas produzidas em várias fases da vida. Além disso, mostramos que indivíduos classificados como saudáveis afetados por hipertensão sub-clínica e tratada apresentaram alterações inflamatórias e disbiose. Esses resultados apontam tais indivíduos como o grupo limítrofe entre a saúde e fragilidade durante a senescência.

ABSTRACT

Aging is a complex phenomenon characterized by changes in the physiological systems of the body and it is associated with several alterations in the phenotype, repertoire and activation status of leukocytes as well as in the cytokine profile produced by these cells. The alteration of the cytokine network seems to be responsible for a chronic proinflammatory status, known as “inflammaging”. This chronic inflammation has been described as a combination of dysfunctional immunity associated with frailty and morbidity in the elderly. Several key mechanisms such as inflammation and altered microbiota composition are common during biologic aging and also in individuals with hypertension. The impact of age-related changes on cytokine global profiles of healthy Brazilian individuals at several age intervals (0–85 years) (population 1) were characterized using short-term cultures of whole blood cells samples and single-cell flow cytometry. In newborns and elderly the contribution of innate immune cells (neutrophils and NK cells) were prominent in the cytokine profile. Adult individuals presented a balanced profile with equal contribution of both compartments (innate and adaptive cells) and both categories of cytokines (inflammatory and regulatory). Considering the high prevalence of Hypertension in Brazilians adults, we characterize the cytokine profile and the composition of microbiota in Brazilian subjects categorized by presence of Arterial Hypertension. Samples were collected from 80 Brazilian subjects with age between 26 to 87 years (population 2). Production of IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-6, IL-10, IL-4 and IL-2 in PBMC supernatant was measured using CBA and flow cytometry. Fecal microbiota composition was analyzed using high-throughput Illumina sequencing of 16S rRNA gene. Hypertension-bearing group was characterized by a reduction in microbiota diversity, with higher Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio, contraction of bacteroidetes population and of the well-known butyrate producers Lachnospiraceae family, Roseburia, Coprococcus. Moreover, the hypertension group showed a higher TNF/IFN- γ ratio and a more inflamed profile compared to the control group. These variations were independent of age. Taken together, our results support the hypothesis that aging is not associated with a progressive decline in cytokine production by all leukocyte subsets but with distinct fluctuations of cytokines produced at various time points during life. Moreover, our findings showed that individuals classified as healthy although bearing sub-clinical hypertension presented inflammatory alterations and disbiosis, which points them as the borderline group between health and frailty during senescence.

INTRODUÇÃO

Hoje, pela primeira vez, na história, a maioria das pessoas pode esperar viver até aos 60 anos ou mais. Este é, em parte, o resultado de grandes reduções na mortalidade em idades mais jovens, particularmente durante a infância e parto, por doenças infecciosas, além dos aumentos contínuos na expectativa de vida. Essas mudanças são dramáticas. Uma criança nascida no Brasil em 2015 pode esperar viver 20 anos mais do que alguém nascido nesse país apenas 50 anos atrás. Quando combinado com as quedas acentuadas na fertilidade que ocorrem em quase todos os países, essas tendências começam a ter impactos importantes sobre a estrutura das populações (UNDESA 2007; Christensen et al 2009; Bloom 2011; Beard et al 2015; 2016).

EPIDEMIOLOGIA DO ENVELHECIMENTO NO BRASIL E NO MUNDO

A população mundial encontra-se em um processo de reestruturação demográfica que se caracteriza pela redução das taxas de fecundidade, diminuição da mortalidade e conseqüente aumento da expectativa de vida. A transição demográfica vem acontecendo de forma heterogênea na população mundial e encontra-se em diferentes fases ao redor do mundo. Muitos países, entre eles o Brasil, vêm passando por mudanças na estrutura etária da sua população, que se reflete em uma diminuição relativa na proporção de crianças e jovens e um aumento na proporção de adultos e idosos. Entre os anos 1940 e 1960, o Brasil experimentou um significativo declínio da mortalidade, mantendo

a fecundidade em níveis bastante altos, o que gerou um rápido crescimento na população jovem. A expectativa de vida ao nascer passou de aproximadamente 41 anos, na década de 30, para 55,7 anos, na década de 60,6 e a taxa de fecundidade total teria passado de 6,2 filhos por mulher, nos anos 40, para 5,8, em 1970. Ao final da década de 60, os níveis de fecundidade passaram a apresentar trajetória descendente, inicialmente nos grupos populacionais mais privilegiados e nos polos mais desenvolvidos, estendendo-se rapidamente às demais regiões (Carvalho, 1974; Ramos et al 1987; Frias e Carvalho 1994; Carvalho e Garcia, 2003; Nasri 2008; Carvalho e Wong, 2008; IBGE, 2011; Closs e Schwanke, 2012)

A participação relativa da população idosa (acima de 60 anos) mais do que duplicou sua importância relativa, passando de 4% em 1940 para 8,6% em 2010 sendo que a projeção do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) para 2020 é de que essa população atinja 13%. O número de indivíduos com 60 anos ou mais duplicará, em termos absolutos, no período de 2000 a 2020, ao passar de 13,9 para 28,3 milhões. Em 2030, de acordo com as projeções, o número de idosos já superará o de crianças e adolescentes (menores de 15 anos de idade), em cerca de 4 milhões, diferença essa que aumenta para 35,8 milhões, em 2050 (64,1 milhões contra 28,3 milhões, respectivamente). Nesse ano, os idosos representarão 28,8% contra 13,1% de crianças e adolescentes no total da população (IBGE, 2009). Assim, em 2050, o Brasil defrontar-se-á com a difícil situação de atender uma sociedade mais envelhecida do que a da Europa atual. O Brasil tem um dos processos de envelhecimento populacional mais velozes no conjunto dos países mais populosos do mundo sendo que ele guarda forte correlação com a velocidade

com que a fecundidade no Brasil reduziu-se desde 1960 (25% em menos de 50 anos). O mesmo envelhecimento demográfico ocorrido na França em 1 século (de 7% para 14% de pessoas acima de 65 anos), ocorrerá no Brasil em apenas duas décadas (Wong e Carvalho, 2006; WHO, 2011).

Além das modificações populacionais, o Brasil tem experimentado uma transição epidemiológica com alterações relevantes no quadro de morbimortalidade. As doenças infecto-contagiosas, que representavam 40% das mortes registradas no País em 1950, hoje são responsáveis por menos de 10%. O oposto ocorreu em relação às doenças cardiovasculares que, em 1950, eram causa de 12% das mortes e, atualmente, representam mais de 40%. Em menos de 40 anos, o Brasil passou de um perfil de mortalidade típico de uma população jovem para um desenho caracterizado por enfermidades complexas e mais onerosas, próprias das faixas etárias mais avançadas (Gordilho et al, 2000). Em geral, o envelhecimento de uma população tem inúmeros reflexos na vida social, influenciando o consumo, a transferência de capital e de propriedades, os impostos, a previdência social, o mercado de trabalho, a saúde e assistência médica, e também a composição e organização das famílias. Uma questão importante, que afeta todos os demais aspectos do impacto social do envelhecimento, é a qualidade de vida dos idosos. Existem doenças crônicas que, antes de representarem risco de vida, constituem uma ameaça à autonomia e independência do indivíduo. Estudos da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, numa coorte na qual 75% dos indivíduos sobrevivem aos 70 anos, uma fração de 1/3 deles será portadora de doenças crônicas e pelo menos 20% terão algum grau de incapacidade associada. Essa constatação leva à preocupação imediata com o aumento da demanda por serviços de saúde e os

custos que isto acarreta. Dentro desse quadro de transição demográfica acelerada que o país experimenta, acreditamos que conhecer melhor quais os parâmetros biológicos são determinantes do envelhecimento saudável pode nos permitir intervir no processo do envelhecimento com o intuito de promovê-lo de forma saudável.

PROCESSO DE ENVELHECIMENTO: PONTO DE VISTA IMUNOLÓGICO

As alterações que constituem e influenciam o processo de envelhecimento são complexas. O envelhecimento está associado com a ocorrência de uma variedade de alterações celulares e moleculares que influenciam toda a fisiologia do organismo. Mudanças fisiológicas relacionadas com a idade podem ser bem exemplificadas pelo sistema imune. Alterações no sistema imune durante o processo de senescência (imuno-senescência) não estão necessariamente associada com a deterioração da atividade do sistema imune, mas com o seu remodelamento (Franceschi et al, 1992; Daynes et al, 1993; Pawelec, 2006; Solana et al, 2006; Pawelec, 2012; Müller and Pawelec, 2014). Nesse sentido, muitas atividades imunológicas estão bem preservadas em idosos saudáveis e elas podem compensar as alterações ocorridas em outras funções imunes.

Vários componentes do sistema imune são afetados pelo processo do envelhecimento, mas é amplamente aceito que os linfócitos T são particularmente atingidos. Dentre as modificações imunológicas que ocorrem com o envelhecimento, podemos destacar a atrofia tímica, com consequente redução da população de células virgens, o aumento de células com fenótipo de memória e o encurtamento de telômeros como consequência da proliferação celular

durante a vida (Solana et al 2006; Salam et al 2013; Fransceschi et al, 2000c, Pawelec and Solana, 2001). A atrofia tímica observada durante o envelhecimento resulta na redução do aporte de linfócitos T virgens desse órgão para a periferia e na diminuição da diversidade clonal desses linfócitos (Hodes, 1995; Pawelec et al, 1998, Fransceschi et al, 2000c, Pawelec and Solana, 2001; Grubeck-Loebenstein et al, 2009; Muller et al 2015). Uma importante característica da imuno-senesescência na imunidade adaptativa é o aumento na proporção de células TCD8 de memória terminalmente diferenciadas (CD28 negativa, CD27, CD45RA, CCR7), que exibem capacidade proliferativa diminuída e são frequentemente consideradas células senescentes (Nikolich-Zugich, 2008; Pawelec et al, 2012). Da mesma forma, ocorre uma expansão das células T CD4 ativadas na periferia como consequência da redução do aporte de células virgens do timo. Essa mudança nos subtipos de células T para um perfil mais diferenciado e populações menos diversificadas (oligoclonais) de células T de memória indica que o repertório linfocitário apresenta uma reatividade restrita a antígenos previamente encontrados. Este é um dos efeitos importantes da imunossenescência com consequências na imunidade e no desenho de vacinas para idosos (Appay and Sauce, 2014).

Entretanto, evidências sugerem que o envelhecimento afeta também a imunidade inata, que, por sua vez, tem impacto na saúde e longevidade (Solana et al, 2006; Müller and Pawelec, 2014).

Componentes celulares da imunidade inata, incluindo neutrófilos e macrófagos, são os primeiros a chegarem ao sítio de infecção. Seu papel é iniciar uma resposta inflamatória, fagocitar o patógeno, recrutar células NK e facilitar a maturação e migração de células dendríticas que irão regular e determinar

a natureza da resposta mediada por células T (Solana et al 2012; Fulop et al, 2016). Vários estudos em imuno-senescência mais recentes têm demonstrado que, somadas às profundas alterações ocorridas na atividade dos linfócitos, a imunidade inata também sofre mudanças relevantes durante o envelhecimento (Solana et al 2012; Fulop et al. 2013). Células importantes da imunidade inata, como monócitos e macrófagos, sofrem várias mudanças durante o envelhecimento. Estudos em camundongos idosos mostrou um declínio funcional de monócitos e macrófagos, baixa expressão de receptores do tipo Toll (TLR) em macrófagos esplênicos e peritoneais ativados, além de secreção alterada de várias quimiocinas e citocinas (Lloberas and Celada, 2002; Renshaw et al, 2002). A redução na expressão de MHC de classe II (HLA-DR) em macrófagos de idosos também contribui para um prejuízo na resposta proliferativa de linfócitos T periféricos ativados (Villanueva et al 1990; Pawelec et al, 1998; Herrero et al 2001; Plowden et al 2004). Já em relação aos neutrófilos, evidências sugerem que embora os idosos preservem seu número e sua capacidade fagocítica, outras características funcionais de neutrófilos, tais como a produção de ânion superóxido, a quimiotaxia e a apoptose, estão alteradas com o envelhecimento (Fulop et al 2004; Solana et al, 2006; Larbi et al 2008; Solana et al, 2012).

No entanto, no complexo cenário da imuno-senescência, alguns aspectos da imunidade inata, como a fagocitose e citotoxicidade de células natural killer (NK), permanecem inalteradas. De fato, algumas respostas da imunidade inata são mais resistentes a mudanças e muitas atividades de células NK estão preservadas em idosos saudáveis (Pawelec et al., 1998; Campos et al, 2014). Nesses indivíduos, ocorre um aumento na frequência de células CD16+ CD57- com alta capacidade citotóxica relacionado com a idade. Exatamente por isto, o aumento na frequência desse subtipo de células NK tem sido correlacionado com o

envelhecimento bem-sucedido ou envelhecimento saudável (Sansoni et al, 1993; Solana et al, 1999; Solana and Mariani, 2000; Speziali et al 2004). Nosso grupo relatou um significativo aumento na frequência de células NK CD16+ IFN- γ + com a idade, em áreas endêmicas para *S. mansoni* no Brasil, sendo que a frequência dessas células permanece alta em indivíduos acima de 70 anos de idade não infectados (negativos para ovos nas fezes). Isso sugere que indivíduos saudáveis (aqueles sem ovos nas fezes em áreas endêmicas) são aqueles que mantêm alta frequência de células NK produtoras de IFN- γ à medida que envelhecem (Speziali et al., 2004). Esses resultados sugerem ainda que as células NK podem desempenhar nos indivíduos idosos de áreas endêmicas o papel desempenhado pelos linfócitos T CD4 nos adultos jovens.

Como relatado, durante o processo de envelhecimento ocorrem várias alterações no fenótipo, no repertório e na ativação de leucócitos, bem como no perfil de citocinas produzidos por essas células (Franceschi et al., 1995; Gerli et al., 2000; Franceschi et al., 2000b; Bruunsgaard et al., 2003; Alberti et al., 2006; Pawelec, 2012; Müller and Pawelec, 2014). As citocinas são componentes chave na comunicação entre células imunes e são responsáveis pela diferenciação, proliferação e sobrevivência dessas células, exercendo um papel essencial na resposta imune, especialmente na inflamação (Franceschi et al 1995; Alberti et al 2006). O processo inflamatório tem funções benéficas como a eliminação de patógenos e de células em apoptose e é de extrema importância para o desenvolvimento e sobrevivência do indivíduo. No entanto, quando o processo inflamatório permanece e se torna crônico e descontrolado leva à persistência de mediadores pró-inflamatórias (como citocinas) e tem, como resultado, o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios crônicos e de doenças degenerativas (Daulatzai et al 2016). As alterações na rede de produção de citocinas, com a

idade, parece ser responsável por um estado pró-inflamatório crônico, conhecido como “inflammaging” (Franceschi et al., 2000a). O “inflammaging” é descrito como uma combinação de uma imunidade disfuncional com um estado de baixo grau de inflamação e é considerado como um fenômeno universal associado com fragilidade e morbidade em idosos (Hobbs et al., 1993; Albright et al., 1995; Franceschi et al., 1995; Shearer, 1997; Pawelec et al, 2002; Alberti et al, 2006; Pawelec et al 2014). Em paralelo ao conceito de “inflammaging”, surgiu também o conceito do “remodelamento” que sugere que a imuno-senescência é o resultado da adaptação contínua do corpo às alterações que ocorrem ao longo do tempo e deve ser considerado um processo altamente dinâmico, no qual os recursos do corpo são continuamente otimizados, incluindo tanto as perdas quanto os ganhos de função imunológica (Franceschi et al.1995; Paolisso et al.2000; De Martinis et al, 2005; Pawelec et al, 2002; Fulop et al 2016). Das reflexões e observações científicas referentes ao balanço entre esses dois fenômenos, surgiu o conceito de “envelhecimento saudável” (em estudos do envelhecimento em centenários na Europa) que descreve o processo de remodelamento bem sucedido do organismo como o passar da idade. O termo eliminou a confusão até então existente entre o envelhecimento e as doenças associadas a ele (Franceschi et al, 2000a; Franceschi et al, 2000b; Franceschi and Bonafe, 2003; Solana et al, 2006; Franceschi et al, 2007; Fulop et al 2016).

O conceito de envelhecimento saudável como remodelamento da inflamação crônica associada à senescência (“inflamm-aging”) tem se mostrado válida para indivíduos da Europa e dos Estados Unidos. No entanto, em países do mundo em desenvolvimento, que contam ainda com populações de indivíduos vivendo em áreas endêmicas para doenças infecciosas como a esquistossomose, a doença de Chagas e a Leishmaniose, um certo aumento da

reatividade inflamatória pode ser benéfico frente aos desafios infecciosos cotidianos (Faria and Franceschi, 2013). Em trabalhos realizados pelo nosso grupo, foi sugerido que não somente os mecanismos inflamatórios estão mantidos, mas elementos da imuno-regulação são importantes para manter o balanço anti-inflamatório nesses indivíduos. A frequência de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+, CD4+LAP+ e CD4+IL-10+ estão aumentadas em idosos infectados em áreas endêmicas (Comin et al, 2008). Provavelmente, a manutenção de mecanismos de imuno-regulação nesses indivíduos esteja relacionada ao recrutamento de mecanismos moduladores pelas próprias células T efetoras e esse balanço resulta em regulação da atividade inflamatória. Por um lado, essas células controlariam a imunopatologia resultante da resposta inflamatória, por outro, reduziriam a capacidade de indução de respostas imunes protetoras, que são necessariamente inflamatórias, resultando em aumento da suscetibilidade à infecção (Comin et al, 2008)

MICROBIOTA, INFLAMAÇÃO E SAÚDE

O trato gastrointestinal de mamíferos é densamente colonizado por microorganismos, comumente referidos como microbiota gastrointestinal. Essa microbiota é composta por bactérias, predominantemente, mas também por fungos, protozoários e vírus. A microbiota intestinal consiste em mais de 10^{14} bactérias, o que é 10 vezes o número de células somáticas no corpo humano (Luckey, 1972; Leser and Molbak, 2009; Hollister et al, 2014). Estudos sugerem que adultos saudáveis compartilham a maior parte da população bacteriana – a microbiota base. A maior parte dessa microbiota base é composta de bactérias

de poucos filos. Em adultos, os filos Bacteroidetes e Firmicutes normalmente são dominantes, enquanto que bactérias dos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Verrucomicrobia, embora encontradas em muitas pessoas, são geralmente menos predominantes (Eckburg et al 2005; Rajilic-Stojanovic et al., 2007; Hollister et al, 2014).

A relação microbiota/hospedeiro em um indivíduo é uma simbiose homeostática, na qual o hospedeiro fornece à microbiota nutrientes e um ambiente estável. Em troca, a microbiota auxilia o hospedeiro na maturação do trato gastrointestinal e do sistema imune associado, impede a colonização por bactérias patogênicas e provê contribuições nutricionais através do metabolismo de carboidratos complexos e síntese de vitaminas (como por exemplo vitaminas do complexo B) (Leser and Molbak, 2009). A microbiota fermenta carboidratos complexos provenientes da dieta em ácidos graxos de cadeia curta (SCFA – small chain fat acid), primariamente acetato, propionato e butirato. A maioria dos SCFA produzidos no intestino grosso é absorvido pelo hospedeiro fornecendo uma fonte energética para colonócitos (Fitch and Fleming, 1999). Outro importante papel dos SCFAs é a imunomodulação através da inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais de camundongos e da regulação da proliferação e da apoptose de células no intestino (Topping and Clifton, 2001; Hooper et al, 2002; Harmsen HJ e de Goffau 2016).

Além da diversidade e da riqueza microbiana, uma microbiota intestinal saudável pode ser definida pela presença de classes de microorganismos que aumentam o metabolismo, a resiliência a infecções e inflamação, dentre outras funções. A microbiota pode mediar esses efeitos através da secreção de fatores que modulam a permeabilidade intestinal, a camada de muco, a função de células epiteliais, a imunidade inata e adaptativa e motilidade intestinal. A presença

representativa de uma base bacteriana de filos, ou base de funções metabólicas, poderia ajudar a definir uma microbiota saudável no trato gastrointestinal. Exemplos de bactérias associadas à saúde e uma função adequada do trato gastrointestinal em humanos incluem Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridium clusters XIVa e IVa (produtores de butirato), Eubacterium, Faecalibacterium, Lactobacillus, and Roseburia (Favier et al., 2002; Ley et al., 2006; Biagi et al., 2011; Yatsunencko et al.2012; Le Chatelier et al, 2013; Hollister et al, 2014).

Em um trato intestinal saudável, a microbiota e o sistema imune associado à mucosa parecem estabelecer um equilíbrio homeostático dinâmico. O envelhecimento é associado com funções fisiológicas alteradas, incluindo a função do sistema imune, que afeta a composição da microbiota intestinal. Nesse contexto, o processo “inflammaging” pode prejudicar esse balanço, levando a mudanças na estrutura e composição da microbiota intestinal (Woodsmansley, 2007; Guioz et al, 2008; Neish, 2009; Biagi et al, 2010; Odamaki et al 2016). A descoberta da diversidade dos microorganismos que compõem a microbiota tem aumentado o interesse da comunidade científica por seu envolvimento na etiologia e desenvolvimento de diferentes condições patológicas, especialmente doenças inflamatórias. Considerando o papel crítico da microbiota na fisiologia do trato intestinal, o processo de envelhecimento pode afetar seriamente a composição da microbiota intestinal humana. Isto levou à hipótese de que mudanças na composição da microbiota associadas à senescência podem contribuir para a progressão de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, como aterosclerose e hipertensão (Tiihonen et al., 2010; Biagi et al 2011; Jose e Raj 2015)

HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA E INFLAMAÇÃO

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) - uma pressão arterial sistólica maior ou igual a 140 mmHg e uma pressão arterial diastólica maior ou igual a 90 mmHg, em indivíduos que não estão fazendo uso de medicação anti-hipertensiva (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) acomete aproximadamente 25% da população mundial, com previsão de aumento de 60% dos casos da doença em 2025. Estima-se que 62% da doença cérebro-vascular e 49% da coronariopatia isquêmica podem ser atribuídas à pressão arterial descontrolada. Além do impacto na morbi-mortalidade das populações, a HAS associa-se a altos custos socioeconômicos. No Brasil, a prevalência de HAS na população urbana adulta brasileira é de 60%. Em inquérito domiciliar em 15 capitais e Distrito Federal sobre fatores de risco e morbidade auto-referida para doenças crônicas não-transmissíveis, a frequência de HAS variou de 16% a 45%. (WHO 2002; Kearney et al 2005; Balu e Thomas 2006; Passos et al 2006; Ribeiro e Plavnik 2007; Brasil, 2012; Ribeiro et al 2016).

Ao longo dos últimos 20 anos, tornou-se consenso que certo grau de inflamação desempenha um papel importante na doença cardiovascular. Mais recentemente, a participação das respostas imunes inata e adaptativa em mecanismos que contribuem para a inflamação em doenças cardiovasculares tem sido relatada em aterosclerose e hipertensão. Estudos têm associado dois mecanismos interligados entre os contribuintes biológicos mais comuns para as doenças cardiovasculares relacionados à idade: (1) inflamação crônica, de baixo

grau (Vasto et al, 2007; Chung et al, 2009; Singh e Newman, 2011) e (2) o aumento do estresse oxidativo celular (Chen et al, 2007;. Harman, 1956;. Valko et al, 2007; Yu e Yang, 1996). Evidências mostram níveis plasmáticos mais elevados de proteína C reativa - PCR (Bautista et al, 2004; Staveling et al, 2004; Sung et al, 2003), IL-6 (Bautista et al, 2005; Chae et al, 2001; Fernandez-real et al, 2001), TNF (Bautista et al, 2005;. Furumoto et al, 2002;. Yu et al, 2010), e IL-1 (Dalekos et al, 1997; Zhao et al, 2004) em pacientes hipertensos em comparação com pares normotensos.

JUSTIFICATIVA

Dentro desse quadro de transição demográfica acelerada que o país experimenta, acreditamos que há uma relevância inédita no estudo dos fatores biológicos que diferenciam, na sua população, os indivíduos idosos saudáveis e ativos daqueles portadores de doenças crônicas desabilitantes.

O conceito de “envelhecimento saudável” se originou dos estudos de centenários na Europa, realizado pelo grupo do Prof. Claudio Franceschi da Università di Bologna, na Itália. Esses estudos demonstraram que o envelhecimento não envolve o declínio inexorável de todas as funções biológicas. Nos centenários, o aumento dos fatores inflamatórios (*inflammaging*) está sempre acompanhado da elevação de fatores reguladores da inflamação e o balanço desses fatores é certamente crucial para o envelhecimento saudável e a longevidade (Franceschi et al, 2007). Então, várias atividades biológicas e, principalmente, vários mecanismos imunológicos sofrem um processo de remodelamento que permite a esses centenários saudáveis (ativos e sem doenças crônicas), compensar as perdas em outras funções vitais do organismo (Franceschi et al, 2000b; Franceschi et al, 2007). As conclusões dos estudos de centenários na Europa, embora importantes na geriatria em geral, têm uma relevância relativa para a análise de uma população como a brasileira. Existem, entre a nossa população e a dos países europeus, diferenças genéticas, ambientais e culturais importantes que podem determinar o curso do remodelamento do organismo dos idosos saudáveis. Tal diversidade genética pode ter um impacto importante na imunosenescência e no envelhecimento saudável. Além disso, como os hábitos culturais e alimentação dos brasileiros também são muito diferentes do que se observa na Europa, a microbiota autóctone dos brasileiros pode também ser distinta e diferentes os efeitos

desta sobre a imuno-senescência. Especialmente se levarmos em consideração que, no Brasil, o aumento da expectativa de vida, que já é semelhante ao de países industrializados, ainda se acompanha da presença de regiões endêmicas para várias doenças infecciosas crônicas típicas de países em desenvolvimento. Nessas populações que contam com populações de indivíduos vivendo em áreas endêmicas para doenças infecciosas como a esquistossomose, a doença de Chagas e a Leishmaniose, um certo aumento da reatividade inflamatória nesses indivíduos talvez seja benéfico frente aos desafios infecciosos cotidianos.

Nesse contexto, entender quais são as funções que deterioram e aquelas que podem compensá-las é um objetivo importante dos estudos geriátricos. Ao mesmo tempo, conhecer melhor quais os marcadores biológicos (como marcadores imunológicos e de microbiota) que são determinantes do envelhecimento saudável e de doenças relacionadas com a idade pode nos permitir intervir nesse processo com intuito de promover um envelhecimento de forma saudável.

Entre os alvos potenciais para a melhoria da saúde em adultos, a hipertensão arterial sistêmica representa um dos mais prevalentes e potencialmente modificável. Hipertensão provoca mais de 7 milhões de mortes prematuras por ano e contribui para 4,5% do total de adoecimentos em todo o mundo (Bramlage e Hasford, 2009). Notavelmente, os idosos representam a maior parte dos que apresentam morbidade e mortalidade relacionada à hipertensão devido à sua maior prevalência entre os idosos (Mozaffarian et al., 2015). De fato, dados recentes da National Health and Nutrition Examination Survey (Estados Unidos da América) demonstraram que 70% dos adultos mais velhos têm hipertensão, em comparação com apenas 32% para adultos com idade entre 40-59 anos (Mozaffarian et al., 2015). Em 2011, as doenças cardiovasculares, incluindo especialmente a hipertensão, foram responsáveis por 31% de todas as mortes,

com doença isquêmica do coração (31%) e doenças cerebrovasculares (30%). No Brasil a Hipertensão Arterial Sistêmica tem sido a principal causa de morte desde a década de 60. Um relatório de 2010 do Institute of Medicine (IOM) chamado de "Hipertensão uma doença negligenciada" descreveu a doença como muitas vezes ignorada pelo público em geral e subestimado pela comunidade médica. "Embora a hipertensão seja relativamente fácil de evitar, simples para diagnosticar e relativamente barato para tratar, permanece a segunda principal causa de morte entre os americanos, e como tal deve ser justamente chamado uma doença negligenciada", disse David W. Fleming, MD, presidente da comissão que elaborou o relatório (Instituto de Medicina et al., 2010; Ribeiro et al 2016).

OBJETIVO GERAL:

Avaliar as alterações em parâmetros imunológicos e na composição da microbiota em população brasileira saudável residente em Minas Gerais considerando diferentes faixas etárias assim como a presença ou ausência de hipertensão arterial relatada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a). Descrever a produção de citocinas, com a idade, em células circulantes da imunidade inata e adaptativa
- b). Caracterizar o impacto da idade no panorama de citocinas em leucócitos circulantes de indivíduos categorizados por faixa etária.
- c). Descrever o perfil funcional de produção de citocinas em linfócitos circulantes com a idade.
- d). Avaliar a produção de citocinas Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, Tumor Necrosis Factor (TNF) e Interferon- γ (IFN- γ) em sobrenadante de cultura de células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) em grupos de acordo com a presença ou ausência de hipertensão arterial relatada.
- e). Avaliar a composição de microbiota intestinal por sequenciamento de nova geração em grupos de acordo com a presença ou ausência de hipertensão arterial relatada.

MÉTODOS:

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (Centro de Pesquisas René Rachou) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CEP-UFMG) (**Anexo 1**). O consentimento escrito dos pacientes ou responsáveis foi indispensável para que os mesmos participassem do estudo.

POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os dados foram obtidos de 2 populações residentes em Minas Gerais Brasil.

A População 1 consistiu de 181 indivíduos saudáveis residentes nos seguintes municípios do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil: Belo Horizonte, Córrego do Melquiades (distrito de Governador Valadares) e Virgem das Graças (comunidade rural pertencente ao município de Ponto dos Volantes no Vale do Jequitinhonha). Foi coletado sangue para os ensaios imunológicos de crianças durante a avaliação pediátrica de rotina, com autorização do responsável legal. As amostras dos adultos foram obtidas de indivíduos saudáveis que aceitaram participar do estudo. A condição de saúde da população 1 foi avaliada em investigações clínicas, exame parasitológico de fezes e avaliação de parâmetros hematológicos pelo hemograma. Foram considerados saudáveis, nesse estudo, os indivíduos sem alterações hematológicas e negativos para o exame parasitológico de fezes.

A população 2 foi composta de indivíduos residentes na área urbana de Governador Valadares, Região leste do estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil, área endêmica para *Schistosoma mansoni*. As etapas de recrutamento e aplicação de questionário na

população 2 foram realizadas na Casa UNIMED, onde foram selecionados de 80 indivíduos de ambos os sexos considerados Robustos.

Os termos Frágil e Rodusto vem sendo discutido por vários autores (Fried et al, 2001; 2004; Rockwood et al 2005) no intuito de operacionalizar esses conceitos de forma a ser utilizado na prática clínica do cuidado do idoso. É consenso que essas ações visam maximizar a independência e autonomia, além de prevenir queda de funcionalidade. Nesse sentido. O grupo de pesquisa em Geriatria e Gerontologia da UFMG propôs a Escala Visual de Fragilidade – VS-Frailty (Figura 1) baseado no conceito multidimensional de fragilidade, uma redução da reserva homeostática e/ou da habilidade de se adaptar a problemas biopsicossociais aumentando a susceptibilidade ao declínio funcional. Essa escala permite uma medida contínua e linear levando em consideração fatores objetivos e subjetivos, ligando extremos do máximo ao mínimo grau de vitalidade e fragilidade, caracterizando 10 categorias clínico-funcionais: Categorias 1, 2 e 3 são idosos robustos (boa reserva homeostática, independente e autônomo), 4, 5 e 6 são idosos sob risco de fragilidade (apresenta certas limitações funcionais sem perder sua independência) e 7, 8 9 e 10 são idosos frágeis (sofrem de declínio funcional estabelecido, sendo dependente em suas atividades) (Nunes de Moraes et al 2016)

A Casa UNIMED é um serviço oferecido pela UNIMED Governador Valadares que atua expressivamente na promoção à saúde e prevenção de doenças, visando a melhoria da qualidade de vida de seus pacientes. Foi inaugurada em 10 de março de 2010, sendo um dos únicos nesses moldes em todo o Brasil. A Casa UNIMED possui uma equipe multidisciplinar de acompanhamento dos pacientes. Essa equipe é composta por profissionais de enfermagem, nutrição, psicologia, fisioterapia, serviço social e terapia ocupacional que realizam atendimentos individualizados, atividades físicas regulares,

oficinas lúdicas, palestras, grupos de convivência, musicalização, aferição de pressão arterial e exames de glicemia.

Baseado na avaliação da condição de saúde dos indivíduos em investigações clínicas e de parâmetros hematológicos já realizados na rotina da equipe da Casa UNIMED, fomos capazes de aplicar os conceitos multidimensionais da VS-frailty nesse indivíduos e selecionar aqueles que se enquadravam na categoria de idoso Robusto (categorias 1 a 3), ou seja, aquele que é capaz de realizar as tarefas do cotidiano, de forma independente e autônoma, mesmo na presença de doenças. Sendo assim, foram incluídas na amostra todas as pessoas que frequentam a Casa UNIMED, com idade acima de 25 anos e consideradas robustas (**Figura 1**).

Amostras de sangue e fezes foram coletadas dos indivíduos que concordaram em participar do estudo. As amostras de sangue foram imediatamente processadas para obtenção de células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC) como descrito posteriormente, e armazenado a -80°C até o uso.

Para avaliação mais detalhada da população a ser estudada foi aplicado um questionário (por um único aplicador) que contemplou perguntas sobre características demográficas e socioeconômicas, uso de cigarros e bebidas alcoólicas, auto-avaliação do estado de saúde e relato de diagnóstico médico de Hipertensão Arterial Sistêmica (**Anexo 2**). O Recordatório Alimentar de 24 horas (**Anexo 3**) foi escolhido como método para medir o consumo alimentar, pois é muito usado na avaliação dietética, especialmente quando o objetivo é analisar o consumo atual de alimentos. Este foi aplicado em três dias, 2 dias úteis e 1 dia de fim de semana, para estabelecer o consumo médio de cada indivíduo e, além de avaliar o total da ingestão de alimentos e nutrientes, foi possível estimar a dieta habitual. O Recordatório foi analisado usando a Tabela Brasileira de Composição de

Alimentos e, então, compilado para resumir as maiores contribuições calóricas de macronutrientes.

Em ambas as populações estudadas, os critérios de exclusão foram: infecção, inflamação aguda e crônica, doenças autoimunes, doenças cardíacas, desnutrição, anemia, leucopenia, transtornos de humor, doenças neurodegenerativas, neoplasias e uso de hormônios (esteróides) e drogas (álcool, antidepressivos, imunossupressores e anticoagulantes). Crianças foram excluídas do estudo se elas apresentassem qualquer evidência de doenças congênitas, infecção, desordens imunológicas ou se estivessem sob efeito de medicações.

Todos os indivíduos que desejaram participar do estudo foram submetidos a exames de fezes usando o método Kato Katz (KATZ et al. 1972). A infecção ativa por parasitos intestinais foi definida pela presença de ovos nas fezes.

Todos os indivíduos (ou seus responsáveis legais) foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo e os que concordaram em participar voluntariamente do projeto foram incluídos após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, **Anexo 4**).

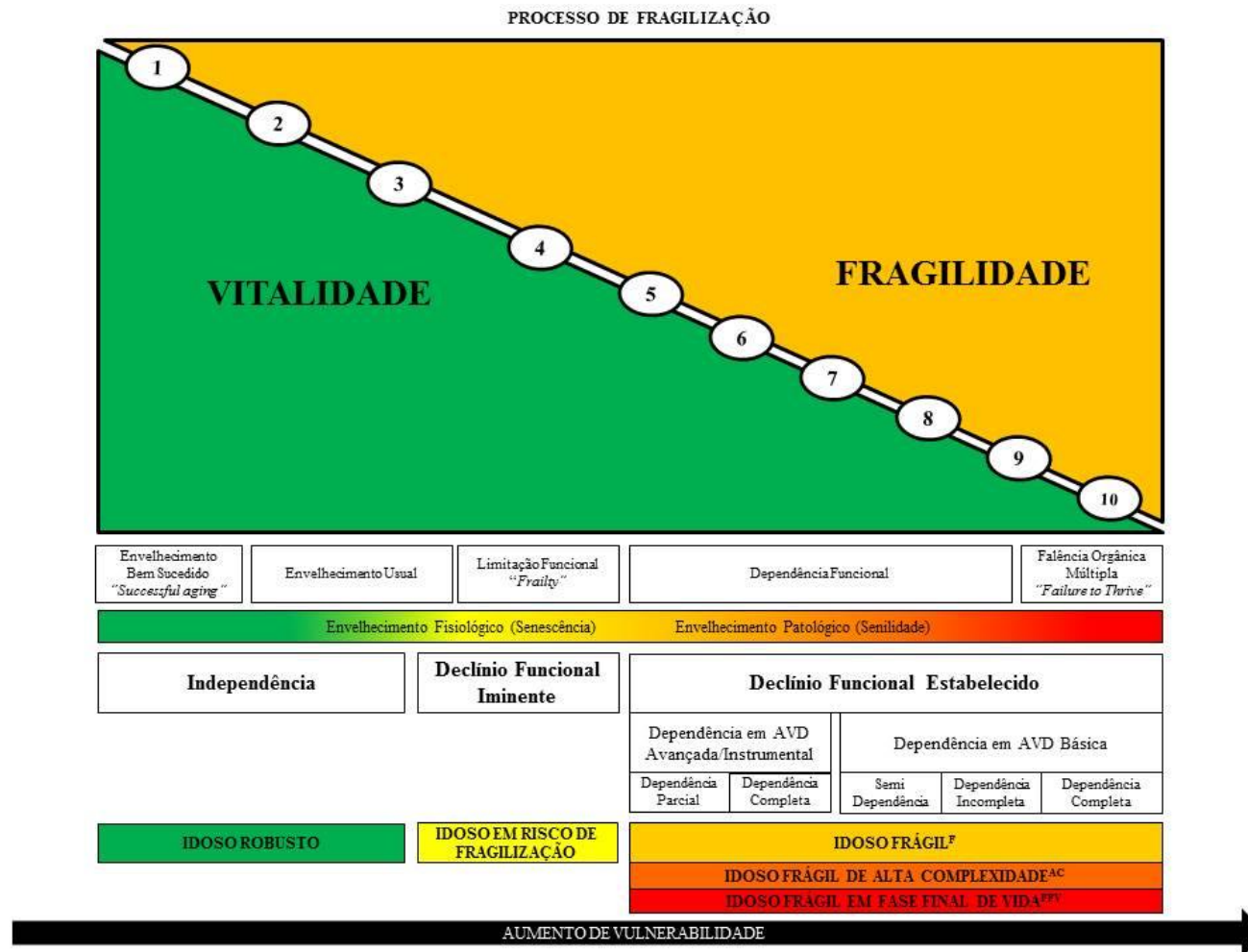


Figura 1. Categorias de saúde e do processo de fragilização do idoso de acordo com sua capacidade funcional (graus de dependência e perda de autonomia), Moraes (2016).

EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

A presença e número de ovos do parasito por grama de fezes foram determinados através do exame das lâminas das amostras de fezes de cada paciente de acordo com o método Kato-Katz (Katz et al. 1972). A contagem de ovos é resultado da média aritmética das três determinações e definida como opg (ovos por grama de fezes).

Avaliação da produção intracitoplasmática de citocinas em subtipos de leucócitos do sangue periférico

Cultura de sangue periférico, avaliação de marcadores de superfície e de citocinas intracitoplasmática

Para avaliar a produção de citocinas por leucócitos circulantes, foi realizada microcultura de curta duração, na ausência de estimulação antigênica (cultura controle). Alíquotas de 500 µl de sangue periférico (coletado a vácuo em tubos de 10 mL contendo heparina sódica) foram adicionadas, em triplicata, em tubos de polipropileno de 14 mL, contendo 500 µl de RPMI-1640. As culturas foram incubadas em estufa de CO₂ com 5% de umidade, a 37°C (Forma Scientific), por 6 horas. Após o período de incubação, 10 µl de brefeldina A (SIGMA 1mg/mL concentração final de 10 mg/mL) foram adicionados a todos os tubos de cultura. A utilização da Brefeldina A promove a retenção da citocina no

complexo de Golgi, permitindo sua detecção no interior celular. As amostras foram submetidas a uma segunda incubação por 4 horas, em estufa de CO₂ com 5% de umidade, a 37°C. Após esta última incubação, 110 µL de EDTA (SIGMA) 20 mM, obtidos de uma solução estoque de 200 mM, diluída 1/10 (concentração final de 2 mM), foram adicionados diretamente às culturas. Este procedimento bloqueia eventual processo posterior de ativação das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Os tubos contendo as amostras foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Para a realização da marcação imunofenotípica e das citocinas intracitoplasmáticas, as amostras de sangue cultivadas, em triplicata, foram vertidas em um só tubo, no qual foi acrescentado 4 mL de PBS Wash (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de albumina bovina sérica – BSA e 0,1% de azida sódica – reagentes SIGMA). As amostras foram centrifugadas a 400g, por 10 minutos, a 18°C. Após a centrifugação, a suspensão de células foi distribuída em tubos de poliestieno 22x75mm previamente rotulados como tubo 1 (CD4 e CD8), tubo 2 (CD14), tubo 3 (CD16 ou CD56) e tubo 4 (CD19) contendo 20 µl anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos nos respectivos volumes de amostras: 200 µl, 100 µl, 100 µl e 100 µl. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando 3 mL de solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) por 10 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, as preparações celulares foram centrifugadas empregando as mesmas condições de centrifugação supracitadas, após a qual, as amostras foram permeabilizadas com 1 mL de

PBS-W e 3 mL de PBS-permeabilizante (P) (PBS 0,015M, pH 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina -reagentes SIGMA) por 10 minutos, à temperatura ambiente. A suspensão celular foi centrifugada a 400g, por 10 minutos, a 18°C, quando foi novamente lavada com PBS-W. Posteriormente, 30 µl das células permeabilizadas foram incubadas em microplacas de 96 poços, de fundo em "U", contendo 20 µl da respectiva solução de anticorpos anti-citocinas marcados com Ficoeritrina (PE), a uma diluição de 1:100 em PBS-P. As amostras foram novamente incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram primeiramente lavadas com 150 µl de PBS-P e, em seguida, com 200 µl de PBS-W. Ao final, foram adicionados 200 µl de solução fixadora (10g/l de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio e 6,67 g/l de cloreto de sódio, pH 7,2). As amostras contendo a suspensão celular a ser analisada foram transferidas para tubos de 500 µl (Thomas Laboratory Specialities) e, posteriormente, submetidas ao procedimento de aquisição de dados em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (30.000 eventos) e a análise dos resultados foram realizadas em citômetro de fluxo - BD FACScalibur™.

Foram avaliadas as produções de TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos T CD4 e T CD8 e de TNF- α , IL-4 e IL-10 em células B no compartimento imune adquirido. Já na imunidade inata, foram avaliadas as produções de TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 em Neutrófilos, de TNF- α e IL-10 em Monócitos e de TNF- α , IFN- γ e IL-4 em células NK.

Análise da população de linfócitos

A **Figura 2** mostra, de forma esquemática, a sequência de procedimentos necessários para a análise dos dados do fenótipo celular e perfil de citocinas intracelulares. O primeiro passo consistiu na identificação, através das características morfométricas, das três diferentes populações de leucócitos em estudo: linfócitos, monócitos e neutrófilos. Para análise de linfócitos e células NK, foram utilizados gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus a granulosidade celular (SSC). Após a seleção da região de interesse por meio de uma janela no gráfico (R1), a frequência de fluorescência das células presentes nesta região, foi analisada em gráficos pontuais de fluorescência 1 (FITC) versus fluorescência 2 (PE) e/ou de fluorescência 2 (PE) versus fluorescência 3 (TC). No exemplo apresentado na Figura 1B temos anti-CD8 FITC versus anti-IL-10 PE.

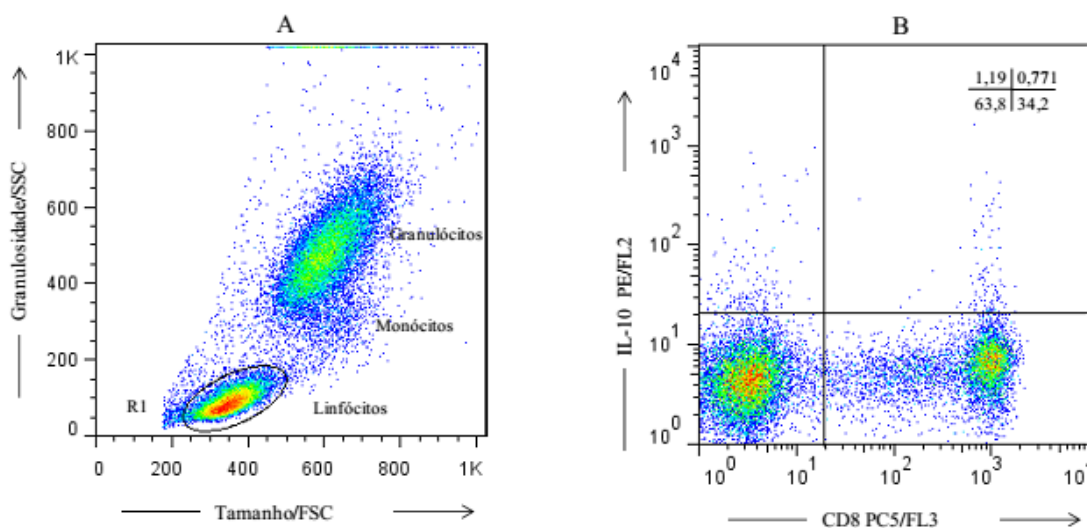


Figura 2: Ilustração da análise convencional de linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. A) Perfil de distribuição celular considerando o tamanho versus granulosidade celular. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 1 (CD8/FITC) versus fluorescência 2 (IL-10/PE), da população selecionada na janela R1 do gráfico.

Análise da população de monócitos

Para análise de monócitos, foi construído um gráfico de fluorescência 3 (TC) para o marcador fenotípico CD14 versus a granulosidade celular. A população analisada foi aquela fortemente positiva para esse fenótipo celular, sendo delimitada por meio de uma janela no gráfico. No exemplo, a janela foi posicionada nas células que apresentaram alta expressão do marcador CD14 (**Figura 3A**). Através dessa abordagem, pode-se obter uma população homogênea e bem diferenciada das demais, não só facilitando a seleção da população de interesse, como também garantindo a sua identificação de forma segura e padronizada. No exemplo apresentado na **Figura 3B** temos a avaliação

da citocina TNF- α produzida por esta população em um gráfico de fluorescência 3 (anti-CD14/TC) versus fluorescência 2 (anti-TNF- α /PE).

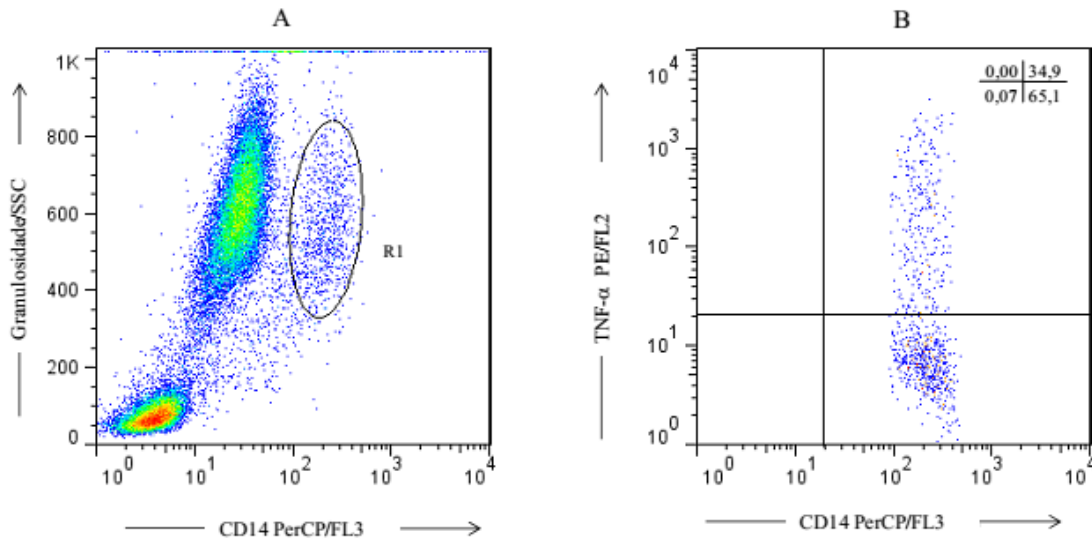


Figura 3: Perfil de análise de monócitos. A) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD14/TC versus granulosidade celular - uma abordagem específica utilizada para análise da população monocitária. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) versus fluorescência 2 (TNF- α /PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A.

Análise da população de neutrófilos

O estudo da população de neutrófilos consistiu na identificação da população celular de interesse, neste caso a população de neutrófilos, através da construção de gráficos de anti-CD16 FITC e/ou antiCD14/TC versus granulosidade, onde essa população celular apresenta distribuição característica (**Figuras 4A e C**). Após a seleção da região (R) de interesse, a mesma foi analisada utilizando-se a frequência de fluorescência (FL) apresentada pelas células presentes na região selecionada através de uma janela (R1), em gráficos de ponto de FL1/FITC versus FL2/PE (**Figura 4B**) e de FL3/TC versus FL2/PE (**Figura 4D**). Para análise das citocinas IFN- γ , IL-4 e TNF- α , os neutrófilos foram selecionados por suas características morfométricas e imunofenotípicas, através de gráficos de distribuição pontual de FL1/CD16 versus granulosidade celular – SSC (**Figura 4A**). Já para análise das citocinas TNF - α , IL-10 e IL-12, utilizando gráficos de FL3/CD14 versus granulosidade celular (SSC); sendo que para a citocina TNF- α , a média das frequências obtidas nas duas estratégias de análise

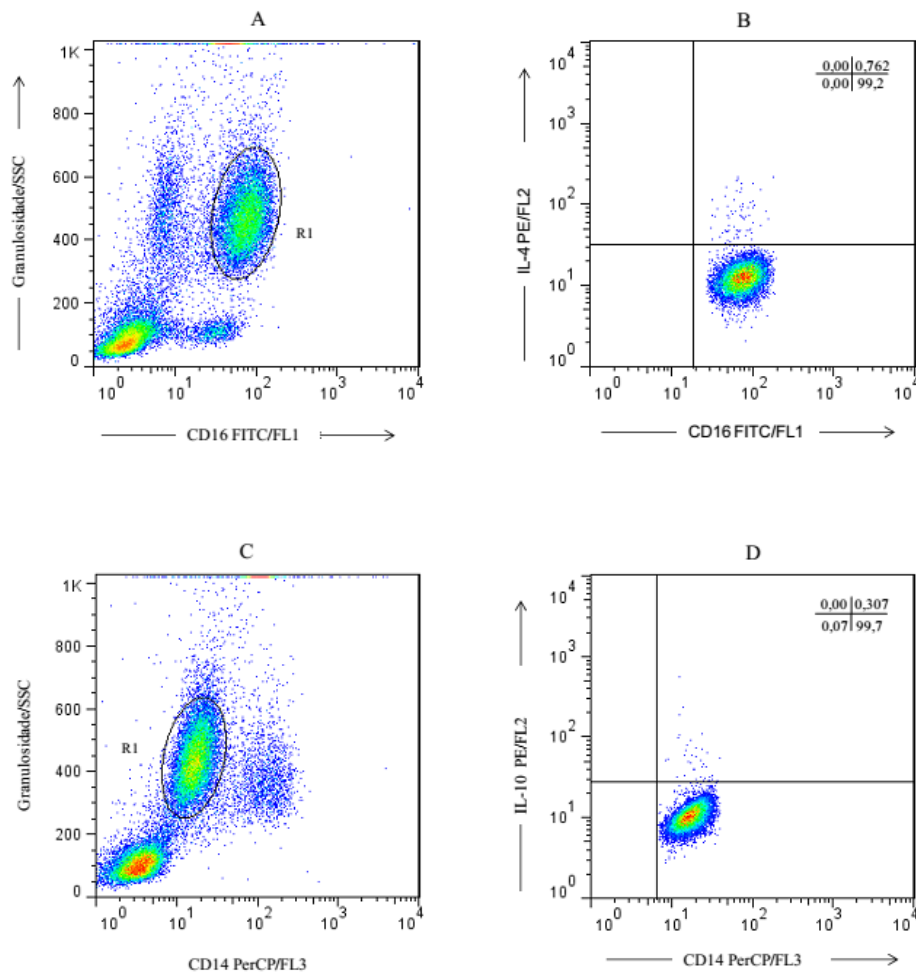


Figura 4: Perfil de análise de neutrófilos. A) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD16/FITC versus granulidade celular. B) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 1 (CD16 /FITC) versus fluorescência 2 (IL-4/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico A. C) Perfil de distribuição celular considerando o marcador fenotípico CD14/ TC versus granulidade celular. D) Perfil de distribuição celular considerando a fluorescência 3 (CD14/TC) versus fluorescência 2 (IL-10/PE) da população selecionada na janela R1 do gráfico C.

Avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PMBC)

As células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) humanas foram separadas segundo procedimento descrito por GAZZINELLI et al. (1983). Para obtenção dessas células, 20 ml de sangue periférico foram coletados a vácuo em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante (Vacutainer®, Becton Dickinson, EUA). O sangue coletado foi diluído 1:1 m PBS diluída 1/10 (a partir de uma solução estoque 10x) e homogeneizado com auxílio de uma pipeta estéril. Em tubo de polipropileno de 14 mL, contendo 20ml de ficoll-hipaque, 30mL do sangue diluído foram adicionados lentamente pelas paredes dos tubos de modo a formar um gradiente. Em seguida, esses tubos foram centrifugados a 900G (2000rpm), durante 30 minutos, a 25° C (Model j-6b Centrifuge, Beckman). Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução separadora e o plasma. O anel de células mononucleares foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur (Thomas Laboratory Specialities, Philadelphia, PA) e transferido para tubos cônicos de polipropileno de 50 ml (Falcon). As células foram, então, lavadas 2 vezes. Na primeira lavagem, as células foram diluídas 1:1 em PBS1x e centrifugadas a 10 minutos, 4°C, 1800rpm. Na segunda, acrescentou-se 20ml de PBS 1X sobre o pellet de células que se formou, homogeneizou e centrifugou por 10 minutos, 4°C, 1500rpm. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu o pellet de células em meio RPMI 1640 (GIBCO) acrescido de 5%

de soro humano AB+ (SIGMA), 3% de antibiótico-antimicótico (solução estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000 µg de estreptomicina e 25µg de fungizona por mililitro, GIBCO BRL) e 1,6% de L-glutamina (Solução estoque: 200Mm, GIBCO, Grand Island, NY, USA) - meio denominado CMBLAST - para posterior contagem das células e cálculos para o plaqueamento. O número de células foi obtido pela contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio ótico, a partir de uma alíquota de células diluída em solução de Turck (1:20). A concentração final foi ajustada com CMBLAST para 1×10^7 células/ml. Toda a manipulação foi realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (BBL-Biological Cabinet, model 60474, Cocheysville, MD).

Obtenção de sobrenadante de cultura de PBMC

$1,0 \times 10^6$ células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO) acrescido de 5% de soro humano AB+ (SIGMA), 3% de antibiótico-antimicótico (solução estoque: 10.000 unidades de penicilina, 100.000 µg de estreptomicina e 25µg de fungizona por mililitro, GIBCO BRL) e 1,6% de L-glutamina (Solução estoque: 200Mm, GIBCO, Grand Island, NY, USA) - meio denominado CMBLAST - foram cultivadas em placas de 24 poços (Falcon, BD) durante 72 hs, sem estímulo antigênico em incubadora contendo 5% de CO₂ (Forma Scientific, Marietta, OH, USA), em atmosfera úmida.

Medida de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC

Os níveis de citocinas Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, Tumor Necrosis Factor (TNF) e Interferon- γ (IFN- γ) nos sobrenadantes das culturas de PBMC foram quantificados através de citometria de fluxo, utilizando-se o ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes (Human Cytokine CBA Kit Th1, Th2, Th17 -Becton Dickinson-BD). A metodologia CBA – BD permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra.

Os sobrenadantes de cultura foram descongeladas em banho Maria a 37°C e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos. Foram preparadas alíquotas de padrões em diluições seriadas com o tampão diluente fornecido pelo fabricante do Kit (diluente G) nas concentrações de 5000 pg/ml (1:1 – Top Standard), 2500 pg/ml (1:2), 1250 pg/ml (1:4), 625 pg/ml (1:8), 312,5 pg/ml (1:16), 156 pg/ml (1:32), 80 pg/ml (1:64), 40 pg/ml (1:128) e 20 pg/ml (1:256). Quinze microlitros da mistura de beads de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF e IFN- γ (Human Cytokine CBA Kit Th1, Th2, Th17) foram adicionados tubos de poliestireno de 5 ml. Em seguida, foram adicionados 25 μ l das amostras, dos padrões e do diluente, que nesse caso, foi usado com tubo controle da reação. Adicionou-se, também, 18 μ l do conjugado marcado com ficoeritrina (PE - FL-2) a cada tubo de reação, sendo estes homogeneizados por 30 segundos cada tubo. Os tubos foram incubados por 180 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a segunda incubação, as amostras foram lavadas com 500 μ l de tampão de lavagem (Wash

Buffer), centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos a 18°C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma bomba de vácuo (FANEM®, Brasil), deixando-se um volume de aproximadamente 200 µl/tubo. Foi realizada a leitura do citômetro BD FACSVersé™.

Analises de produção de citocinas

Análise de assinatura de produção de citocinas intracitoplasmática em leucócitos do sangue periférico

Na análise do perfil de citocinas intracitoplasmáticas em leucócitos do sangue periférico, inicialmente obteve-se a porcentagem de células positivas para produção de citocinas. Então, para a avaliação da assinatura de citocinas, utilizou a estratégia de alta e baixa produção de citocinas anteriormente descrita por Luiza-Silva et al. (2011), brevemente, segrega-se o grupo de estudo em alta (>mediana global) e baixa (\leq mediana global) frequências de células produtoras de citocinas utilizando-se a mediana global da frequência das células produtoras de cada citocina como ponto de corte. Para o cálculo dessa mediana, foi considerado todo o universo de dados obtidos para os grupos inseridos no estudo. As populações de neutrófilos (NEU), monócitos (MON), células NK e linfócitos, e suas medianas globais da frequência de células produtoras de citocinas foram descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Mediana global da frequência de células produtoras de citocinas do universo de dados de citocinas produzidas por leucócitos

Compartimento imune	Leucócito produtor de citocinas	Mediana Global
Inata	Neutrófilos TNF+	0,51
	Neutrófilos IFN- γ +	0,34
	Neutrófilos +IL-4+	0,43
	Neutrófilos +IL-10+	0,19
	Monócitos TNF- α +	32,20
	Monócitos+IL-10+	3,00
	Célula NK TNF+	0,18
	Célula NK IFN- γ +	0,21
	Célula NK IL-4+	0,19
Adquirida	Célula T CD4 TNF+	0,28
	Célula T CD4 IFN- γ +	0,26
	Célula T CD4 IL-4+	0,32
	Célula T CD4 IL-5+	0,11
	Célula T CD4 IL-10+	0,75
	Célula T CD8 TNF+	0,34
	Célula T CD8 IFN- γ +	0,28
	Célula T CD8 IL-4+	0,27
	Célula T CD8 IL-5+	0,14
	Célula T CD8 IL-10+	0,40
	Célula B TNF- α +	0,41
	Célula B IL-4+	0,30
	Célula B IL-10+	0,57

Esse tipo de estratégia permite a realização de múltiplas análises comparativas entre grupos, sem que nenhum deles seja excluído da análise.

Produção de citocinas em células da imunidade Inata e Adaptativa

O perfil imune global é representado como percentagem de indivíduos com células da imunidade inata e adquirida produtoras das citocinas avaliadas em alta frequência. Essa abordagem mostrou ser relevante para destacar mudanças na assinatura de citocinas não detectadas por abordagens estatísticas convencionais. O aumento ou diminuição da frequência de células produtoras de citocinas nas faixas etárias foi considerada por significativa correlação positiva ou negativa pelo Teste de correlação de Spearman.

Avaliação do panorama de citocinas intracitoplasmáticas

Os gráficos de radar foram usados para abordar a assinatura global de citocinas pró-inflamatórias (■) ou reguladoras (■) em subtipos de leucócitos da imunidade inata e adaptativa em cada grupo de estudo. Dessa forma, esse tipo de análise destaca a contribuição dos diferentes subtipos de leucócitos para o balanço global de citocinas. No gráfico de radar, cada eixo representa a frequência (%) de voluntários que apresentam alta frequência de células produtoras de citocinas. Os valores de cada eixo podem ser unidos para formar uma área poligonal central que representa o balanço geral pró-inflamatório ou regulador. O aumento ou diminuição da área poligonal central reflete uma maior ou menor contribuição do perfil pró-inflamatório ou regulador em cada grupo.

A alta produção de células produtoras de citocinas também foi avaliada utilizando a estratégia de curva ascendente que foi criada para cada grupo de

estudo. Essa abordagem permite analisar o comportamento e a hierarquia de produção (e conseqüente contribuição para a o perfil imunológico) das células produtoras de citocinas. Nessa análise, foi utilizada a categorização funcional das citocinas como a seguir: TNF e IFN- γ - citocinas inflamatórias em barras vermelhas e IL-4, IL-5 e IL-10 – citocinas reguladoras em barras azuis. Produções relevantes foram consideradas quando a percentagem de indivíduos com alta frequência de células produtoras de uma dada citocina for maior que 50%

Análise da produção de citocinas em sobrenadante de PBMC leucócitos do sangue periférico

Para a avaliação da produção de citocinas em sobrenadante de PBMC, realizou-se a comparação tradicional em dois grupos com o teste não paramétrico Mann-Whitney U. Com a necessidade de uma análise mais aprofundada e complexa, avaliou-se da produção de citocinas também com a estratégia de alta e baixa produção de citocinas anteriormente descrita por Luiza-Silva et al. (2011). Após a determinação de alto produtores de citocinas em cada grupo, essa frequência foi ordenada de forma crescente para criar uma curva ascendente de produção, gerando, assim uma assinatura de citocinas para cada grupo. Para cada assinatura de citocina, aquelas que obtivessem uma frequência maior que 50%, foram consideradas com uma produção relevante à formação do perfil imunológico. Com o intuito de verificar como as relações entre os tipos de resposta imune, realizou-se razões entre as citocinas comparando-

as entre os grupos de estudo. O teste não paramétrico Mann-Whitney U foi utilizado para avaliar diferenças estatisticamente significativas, consideradas quando $p < 0,05$

Para avaliação do status inflamatório de cada grupo, utilizou-se a estratégia de Score inflamatório já utilizado em estudos anteriores (Duncan et al., 2003; Recasens et al., 2005; Biagi et al., 2010). Para essa análise, foram utilizadas as citocinas inflamatórias avaliadas. Então, para obter o score, para cada valor acima da mediana global o indivíduo obtinha 1 ponto no score.

Análise da microbiota bacteriana nas fezes

Extração de DNA das fezes

DNA total microbiano foi extraído das fezes utilizando-se QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany) com um protocolo modificado. Cerca de 250 gramas de fezes foram ressuspendidas em 1ml de tampão de lise (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,50 mM EDTA, 4% SDS). Quatro esferas de vidro de 3 mm e 0,5 g de 0,1 mm de esferas de zircônia (BioSpec Products, Bartlesville, OK) foram adicionadas e as amostras serão tratadas in FastPrep (MP Biomedicals, Irvine, CA) a 5,5 ms por 3 min. As amostras foram aquecidas a 95° C por 15 min, centrifugadas por 5 min a plena velocidade para peletizar as partículas de fezes. 260 µL de acetato de amônia a 10 M serão adicionados aos sobrenadantes, seguido de incubação no gelo por

5 min e centrifugação em plena velocidade por 10 min. Um volume de isopropanol foi adicionado a cada amostra e estas serão incubadas por 30 min em gelo. O ácido nucléico precipitado foi coletado por centrifugação por 15 min a plena velocidade e lavado com 70% etanol. Os pellets foram ressuspensos em 100µL de tampão TE e tratados com 2 ml de RNase livre de DNase (10 mg/ml) a 37° C por 15 min. A remoção de proteína pelo tratamento com Proteinase K e a purificação do DNA com colunas QIAmp Mini Spin foram realizadas de acordo com o protocolo do kit. A concentração final do DNA foi determinada utilizando-se NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

Sequenciamento e processamento dos genes rRNA16S

Amplificação e sequenciamento dos genes rRNA 16S

Para a amplificação do rRNA 16S bacteriano total foram selecionadas as regiões V3 e V4 e utilizados os primers

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3' (forward)

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'

Foram utilizados 10µL de cada primer, 5 µL (2,5 ng/µL) de DNA amostral, 25µL de 2x KAPA HiFi HotStarter ReadyMix, 200 mM de dNTPs e 2 mM de MgCl₂ em um volume final de 50 µl. O PCR foi realizado Biometra Thermal Cycler T Gradient (Biometra) conforme os seguintes passos: Desnaturação inicial à temperatura de 95° C por 5 minutos; 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 50

segundos cada; anelamento a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 30 segundos; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Após essa amplificação de DNA, foram adicionadas sequências inequívocas denominadas Dual Index que permitem discriminar a qual amostra pertence as sequências marcadas e ainda contém os adaptadores necessários ao sequenciamento na plataforma Illumina. Os amplicons resultantes possuem aproximadamente 460 pares de bases. Todas as amostras foram adicionadas em solução equimolar, desnaturadas com 0,2 N NaOH e diluídas a 8pM com 20% PhiX control. O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq usando 2 x 300 pb segundo instruções do fabricante (Illumina, San Diego, CA).

Análise por Bioinformática

Todas as sequências obtidas do sequenciamento por Illumina MiSeq® foram analisadas seguindo a pipeline *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME), descrita por Caporaso et al (2010). O QIIME permite a comparação e análise da comunidade microbiana baseando-se nos dados de sequenciamento de alto rendimento (*highthroughput*), obtidos pela plataforma 454 ou Illumina. Então, obtêm-se as sequências de DNA microbiano, retira-se as sequências dos *primers*, filtra possíveis erros de sequência e obtêm-se as sequências do DNA microbiano de cada indivíduo (previamente marcado por um Dual Index). Essa filtragem inicial pelo QIIME gera uma tabela de *Operational Taxonomic Units* (OTU) que vem subdividida nos níveis de Filo a Espécie. Com

esse arquivo já é possível obter a abundância relativa de cada Filo a cada Espécie microbiana em cada indivíduo avaliado.

O método baseado em OTU permite analisar os índices de riqueza e a diversidade de uma comunidade bacteriana. Para os cálculos dos índices foram utilizados como limites de corte os valores de 97% para identificar a sequência de espécie e de 94% de gênero.

A análise da diversidade foi mensurada através da diversidade alfa e beta.

A diversidade alfa foi calculada por diversidade filogenética, riqueza de Chao1, espécies observadas e índice de diversidade Shannon. A diversidade filogenética leva em conta a soma das distâncias dos vários braços da árvore filogenética como uma medida de biodiversidade. O método Chao 1 estima a riqueza total utilizando o número de espécies (OTU) representadas por apenas um indivíduo nas amostras (*singletons*), e o número de espécies (OTU) com apenas dois indivíduos nas amostras (*doubletons*). As espécies observadas se baseiam no número simples de espécies observadas na amostra. O índice de diversidade Shannon se refere a variedade e à complexidade de espécies de uma comunidade.

A diversidade beta foi estimada computando *weighted and unweighted UniFrac distances*, que foram usadas para realizar *Principal Coordinates Analysis* (PCoA).

As análises estatísticas do perfil de microbiota foram utilizados no software R versão 3.1.3. As análises de *UniFrac distances* foram plotadas pelo *vegan package* e as análises de coordenadas principais (PCoA) foram testadas usando o teste de permutação com *pseudo F ratios* (função *adonis*). Diferenças

significativas da abundancia relativa foram avaliadas por Mann-Whitney U test e $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

As análises foram direcionadas para investigar biomarcadores associados ao envelhecimento saudável utilizando, como critério para essa classificação, as categorias descritas por Moraes e colaboradores (Moraes et al, 2016). Analisamos também o efeito da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), uma doença crônica altamente prevalente e relacionada à idade, nesses biomarcadores.

Numa primeira abordagem, avaliamos o impacto da idade na assinatura de citocinas na população 1, segregando-a em grupos etários (Artigo a ser submetido em Anexo 5). Num segundo momento, avaliamos o impacto da Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), como exemplo de doença relacionada com o envelhecimento, no perfil imunológico da População 2, segregando-a pela presença de HAS relatada. Finalmente, analisamos também como a composição de microbiota intestinal se comporta na presença ou ausência de HAS (Manuscrito em preparação).

Variações na produção de citocinas por subtipos de leucócitos ao longo da vida

Os 181 indivíduos da População 1 foram categorizados em 6 faixas etárias descritas a seguir: : Recém-nascidos – 0 anos (n= 12); Crianças – 6 – 10 anos (n=23); Adolescente – 11 – 20 anos (n=22); Adultos - 21-50 anos (n=80); Meia Idade – 51 – 60 anos (n=22); Idosos - 61-85 anos (n=22). Essas faixas etárias

foram baseadas nas principais mudanças imunológicas que ocorrem durante a vida (nascimento/início da infância, infância, adolescência, vida adulta jovem e média, velhice) bem como padrões similares observados para marcadores fenotípicos adquiridos durante a vida (Faria, 2008).

As análises foram direcionadas para investigar o perfil de citocinas relacionado à idade, produzidas por leucócitos da imunidade inata e adaptativa. Avaliou-se a produção de TNF, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos T CD4 e T CD8 e de TNF, IL-4 e IL-10 em células B. Além disso, avaliou-se também a produção, com a idade, de TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-10 em Neutrófilos, de TNF e IL-10 em Monócitos e de TNF, IFN- γ e IL-4 em células NK. Essa análise contempla indivíduos saudáveis categorizados por faixa etária. Em todas as análises, os indivíduos foram categorizados em portadores de alta ou baixa frequência de células produtoras de citocinas, utilizando como ponto de corte a mediana global para cada citocina (como sugerido por Luiza e colaboradores, 2011), então foi possível calcular a percentagem de indivíduos com alta frequência de células produtoras de citocinas para cada faixa etária (figura 4). Com o objetivo de avaliar o perfil funcional de citocinas nas faixas etárias, nós classificamos as citocinas em pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) e reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-10) de acordo com suas características funcionais durante o processo de envelhecimento.

Os gráficos das **figuras 5 e 6** representam as percentagens de indivíduos com alta frequência de células produtoras de citocinas em subtipos de leucócitos para cada faixa etária. Produções relevantes de citocinas, em cada grupo, foram consideradas quando a percentagem de indivíduos com alta frequência de

células produtoras for maior que 50%. Nessa análise, avaliamos o perfil de produção de citocinas em subtipos de leucócitos nos compartimentos adaptativo (linfócitos TCD4, TCD8 e B) e inato (neutrófilos, monócitos e células NK). De uma forma geral, observamos um distinto perfil de produção de citocinas durante a vida.

Um ponto interessante no perfil de citocinas em células da imunidade inata foi a significativa redução de neutrófilos produtores de TNF da infância à vida adulta, quando esta atinge um platô, enquanto que as frequências de células produtoras de IFN- γ e IL-4 diminuem já na infância. Por outro lado, em adultos e indivíduos de meia-idade, neutrófilos produtores de IL-10 aumentam. A frequência de monócitos produtores de TNF aumenta do nascimento à infância, se mantém alta durante adolescência e vida adulta, e diminui somente na velhice. Digno de nota, monócitos produtores de IL-10 estão presentes em baixas frequências durante infância e adolescência e ocorre um progressivo aumento nessa frequência em adultos e idosos. A frequência de células NK produtoras de IFN- γ e IL-4 aumenta nos idosos a partir da vida adulta e meia idade respectivamente (**Figura 5**)

Durante o processo de envelhecimento, as células T-CD4 tendem a aumentar a produção de TNF, que foi significativo dos adultos aos idosos, enquanto TNF em células T-CD8 e células B diminuem a frequência. Considerando a produção intracelular de IFN- γ , somente células T-CD4 apresentaram mudanças: essa produção aumentou da vida adulta à meia idade. Uma significativa redução de IL-4 em células T CD8 foi observada durante a vida, especialmente da adolescência à senescência. Um interessante padrão foi

encontrado no perfil de produção de IL-5 em células T. Ao nascimento, houve uma alta frequência de células T-CD4 e CD8 produtoras de IL-5, então essas frequências reduzem durante a infância e tornam a aumentar na adolescência, se mantendo em torno de 50% de células alto produtoras durante a vida adulta. Dos 50 anos de vida à senescência, a frequência de células T-CD4 e CD8 produtoras de IL-5 voltam a aumentar. Um importante achado foi que as frequências de todos os linfócitos (células T e B) produtores de IL-10 se reduziram da adolescência à senescência (**Figure 6**).

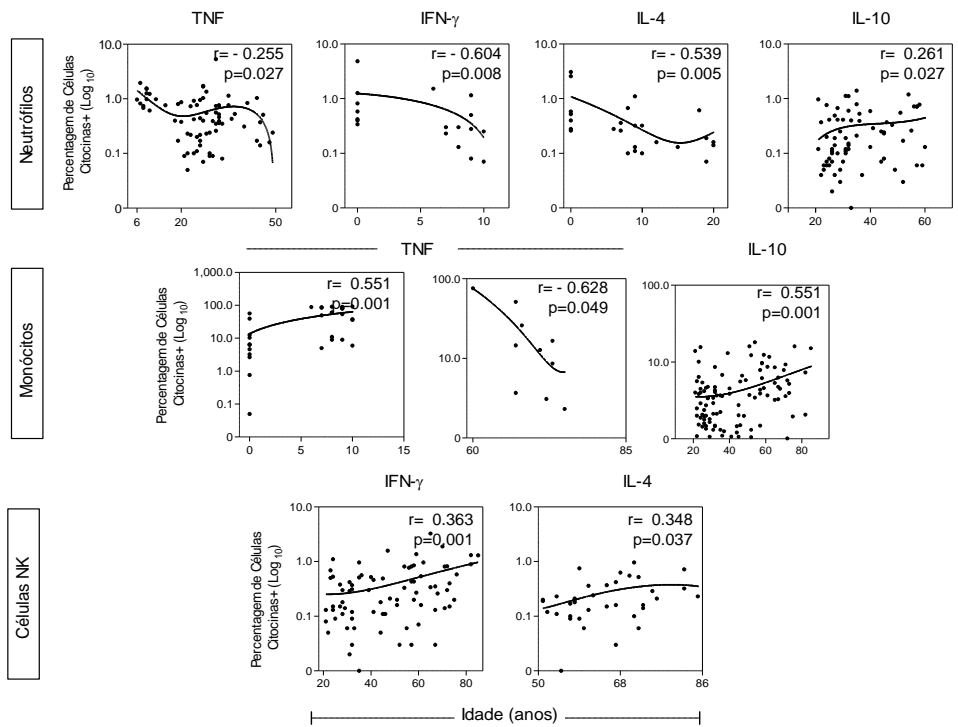
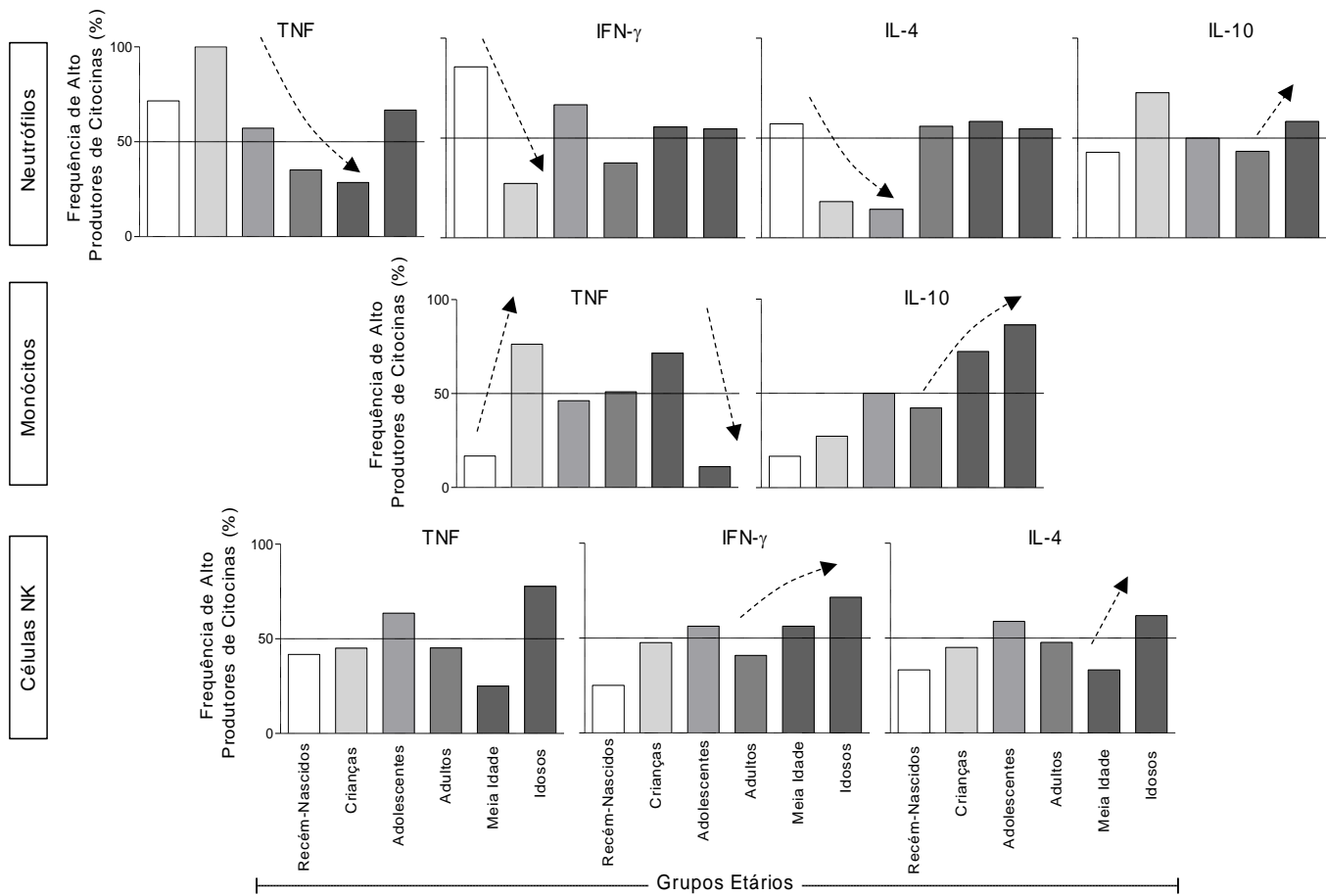


Figura 5: Perfil de indivíduos com alta frequência de neutrófilos, monócitos e células *natural killer* (NK) produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras. (A) O padrão geral de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras está representado em percentagem de indivíduos com alta frequência de células produtoras de citocinas em cada grupo etário, representados pelas barras, como segue: recém-nascido – 0 anos (n= 12); Criança – 6 – 10 anos (n=23); Adolescente – 11 – 20 anos (n=22); Adultos - 21-50 anos (n=80); Meia idade – 51 – 60 anos (n=22); Idosos - 61-85 anos (n=22). As citocinas e subtipos celulares avaliados foram: Neutrófilos produtores de Tumor necrosis factor (TNF), Interferon (IFN)- γ , Interleucina (IL)-4 e IL-10, Monócitos produtores de TNF e IL-10, e células NK produtoras de TNF, IFN- γ e IL-4. Diferenças relevantes foram consideradas quando a percentagem de indivíduos com alta frequência células produtoras de uma determinada citocina for acima do percentil 50 (linha contínua). A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar aumento ou diminuição na frequência de células produtoras de citocinas entre os grupos etários. Correlações positivas ou negativas significativas foram representadas por setas pontilhadas (\uparrow). (B) O coeficiente de Spearman correspondente (r) e o valor de p entre a frequência de citocinas produtoras de celular e idade em anos é mostrado.

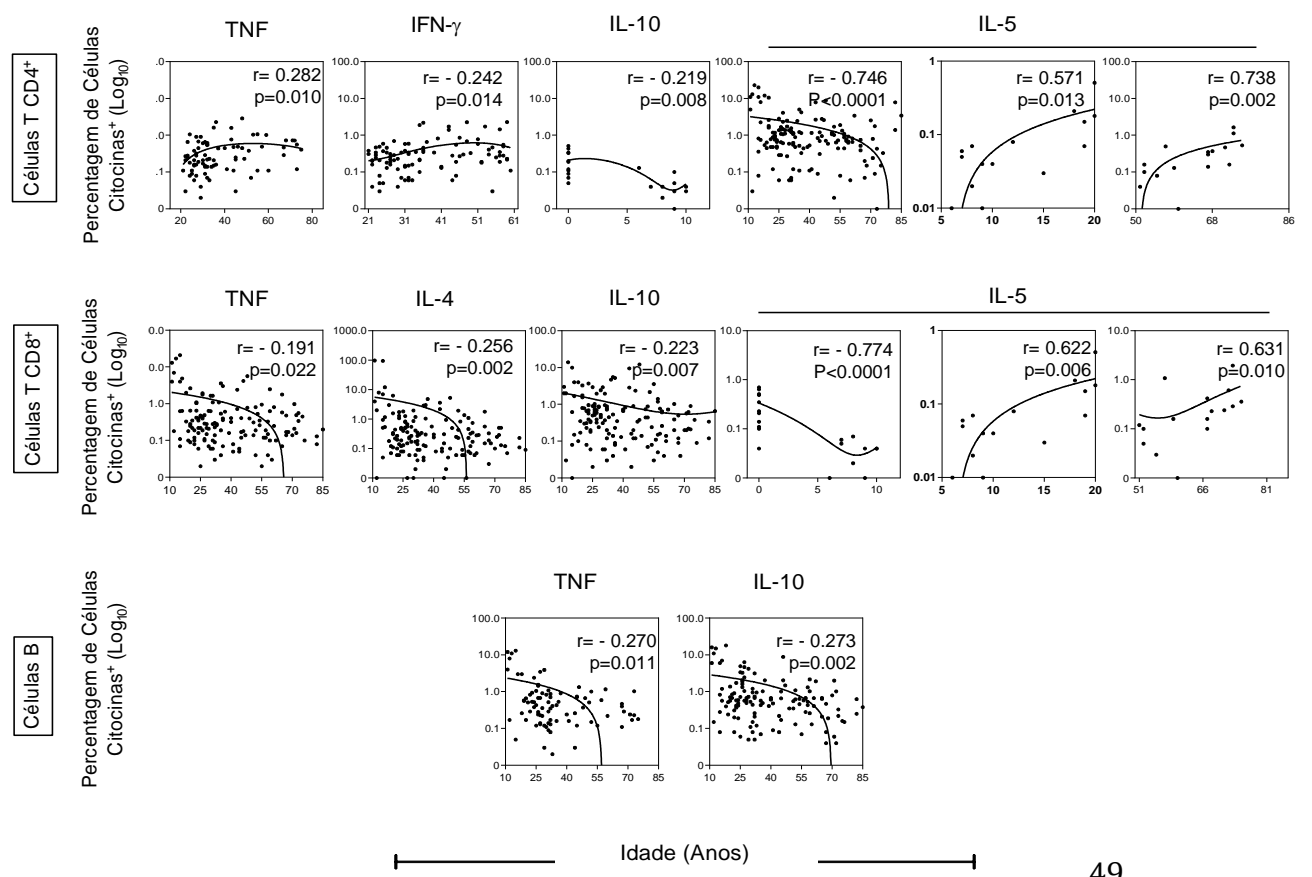
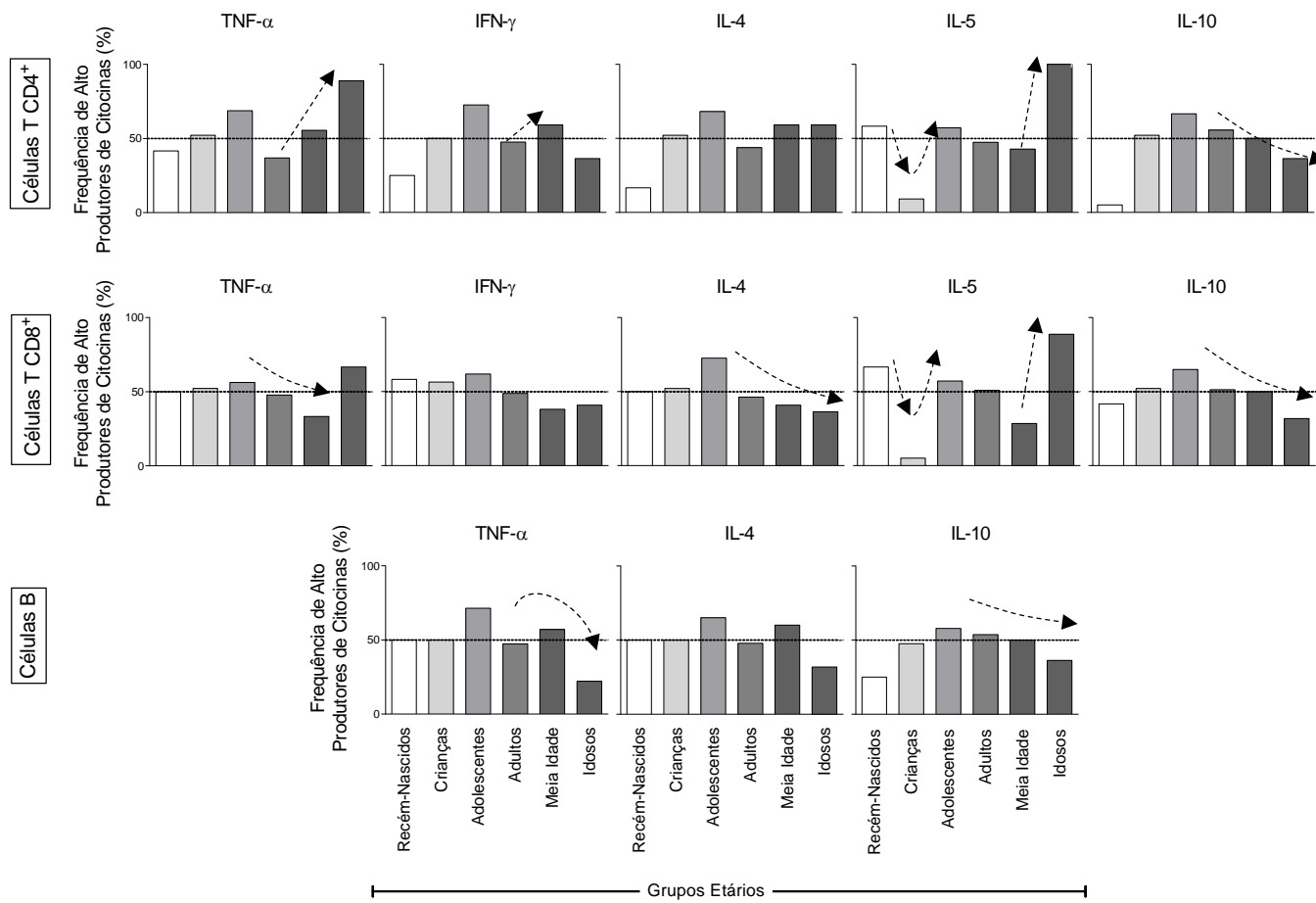


Figura 6: Perfil de indivíduos com alta frequência células T CD4+, células T CD8+ e células B produtoras de citocinas pró-inflamatória e reguladoras. (A) O padrão geral de citocinas inflamatórias e reguladoras é apresentada como percentagem de indivíduos com alta frequência de células produtoras de citocinas em cada grupo etário, como se segue: recém-nascido - 0 anos (n = 12); Crianças - 6 - 10 anos (n = 23); Adolescente - 11 - 20 anos (n = 22); Adultos 21-50 - (n = 80); Meia-Idade - 51 - 60 (n = 22); Idosos - 61-85 (n = 22). As barras representam a percentagem de indivíduos com uma frequência elevada de células T CD4 + produtoras de Tumor necrosis factor (TNF), Interferon (IFN)- γ , interleucina (IL) -4, IL-5 e IL-10. Células T CD8 + produtoras de TNF, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. As células B produtores de TNF, IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10. Diferenças relevantes foram consideradas quando a percentagem de indivíduos com alta frequência células produtoras de uma determinada citocina for acima do percentil 50 (linha contínua). Correlação de Spearman foi realizada para avaliar aumento ou diminuição na frequência de células produtoras de citocinas entre os grupos etários. Correlações positivas ou negativas significativas foram representadas por setas pontilhadas (\uparrow). (B) O coeficiente de Spearman correspondente (r) e o valor de p entre a frequência de citocinas produtoras de celular e idade em anos é mostrado.

Perfil imunológico de indivíduos com alta frequência de células da imunidade inata e adaptativa produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras

Com o intuito de caracterizar o perfil de citocinas de indivíduos saudáveis categorizados por faixa etária, construiu-se gráficos de radar para avaliar a assinatura de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras em leucócitos em cada grupo etário (**Figura 7**) e gráficos de curvas ascendentes para analisar a contribuição hierárquica de tipo celulares produtoras de citocinas em diferentes faixas etárias (**Figura 8**)

Os resultados demonstram que o perfil de citocinas em recém-nascidos foi caracterizado por uma proeminente participação de respostas pró-inflamatórias do compartimento imune inato, com predominância de neutrófilos produtores de TNF e IFN- γ . Esse perfil parece ser contrabalanceado por um microambiente de citocinas reguladoras especialmente IL-5 em células T. De acordo com os achados desse trabalho, os neutrófilos parecem ter um importante papel na infância. Essas células inatas, juntamente com monócitos, produzem grandes quantidades de TNF, enquanto que neutrófilos também produzem altos níveis de IL-10 criando um circuito compensatório de citocinas (**Figura 7 e 8**)

Na adolescência (11 a 20 anos), pode-se observar uma mudança na composição do perfil de citocinas. Nessa faixa etária, houve um predomínio de uma resposta imune adaptativa, com participação de citocinas pró-inflamatórias como TNF em células T e B, e IFN- γ em células T CD4 e CD8, além da

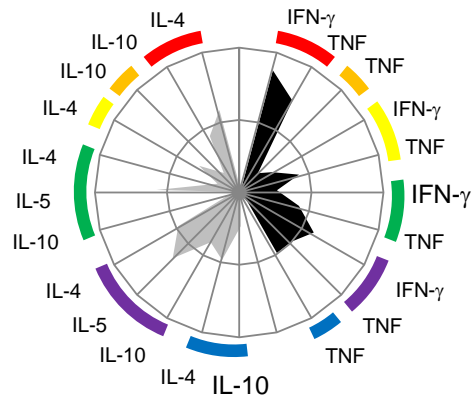
contribuição de citocinas reguladoras como IL-4, IL-5 e IL-10 produzidas por Linfócitos T e B. Células da imunidade inata também têm participação na resposta imune de adolescentes: TNF e IFN- γ produzidos por neutrófilos e células NK, bem como IL-4 produzidos por células NK (**Figura 7 e 8**).

Adultos apresentam um perfil bem equilibrado entre respostas imunes inata e adaptativa com contribuições equivalentes de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras (**Figura 7 e 8**).

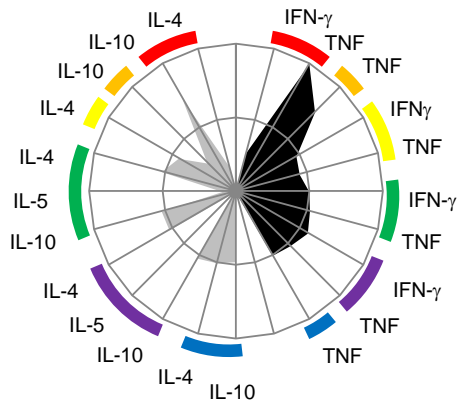
Outra mudança na composição de citocinas observada ocorreu a partir da quinquagésima década de vida. Indivíduos de meia idade alteraram seu perfil de um perfil balanceado quando adultos para uma maior contribuição do compartimento inato. No grupo de meia idade, observa-se alta frequência de neutrófilos produtores de TNF, IL-4 e IL-10, de monócitos produtores de TNF e IL-10 e de células NK produtoras de IFN- γ . Um importante perfil inflamatório é ainda presente nesse grupo pela contribuição do compartimento imune adaptativo com frequências altas de células T CD4 e B produtoras de TNF e IL-4 e de células T CD4 produtoras de IFN- γ (**Figura 7 e 8**).

As mudanças no grupo idoso foram caracterizadas por um perfil balanceado com predominância da imunidade inata dirigida por monócitos produtores de IL-10, neutrófilos produtores de IL-4, TNF e IFN- γ e células NK produtoras de TNF e IFN- γ . Embora a imunidade inata tenha um papel mais relevante em idosos, a contribuição da imunidade adaptativa pode ser percebida na produção de IL-5 e TNF por células T e de IL-4 por células T CD4 (**Figura 7 e 8**).

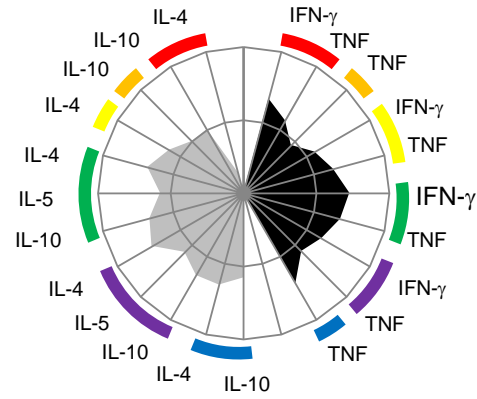
Recém-Nascido



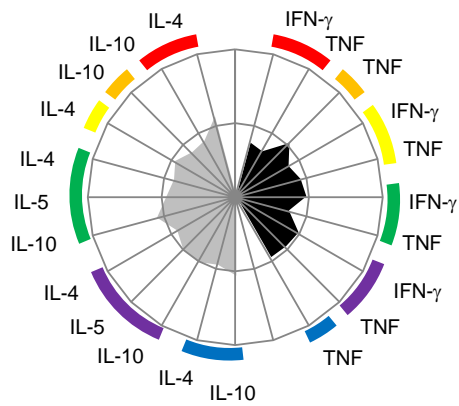
Crianças



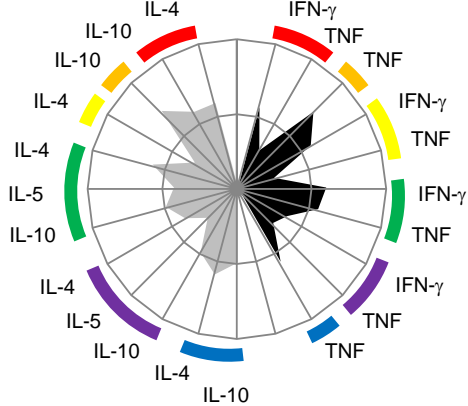
Adolescentes



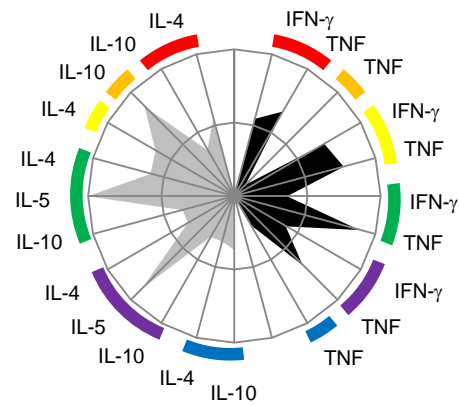
Adultos



Meia Idade



Idosos



- Neutrófilos
- Monócitos
- Células NK
- Células T CD4⁺
- Células T CD8⁺
- Células B

Figura 7: Gráfico em radar representa o balanço nos indivíduos entre a alta frequência de células produtoras de citocinas inflamatórias (■) ou reguladoras (■) nos compartimentos da imunidade inata e adaptativa. Os gráficos foram construídos com cada eixo exibindo a proporção de indivíduos com frequência elevada de células produtoras de citocinas dentro de um dado subtipo de leucócitos. Os valores de cada um dos eixos foram unidos para formar a área poligonal central que representa o equilíbrio global de citocinas inflamatórias ou reguladoras. O aumento ou redução das áreas poligonais centrais refletem maior ou menor contribuição de citocinas inflamatória ou reguladora em cada faixa etária. A análise dos eixos do gráfico radar destaca a contribuição dos diferentes subtipos de leucócitos para o equilíbrio global de citocinas. As faixas etárias foram categorizadas como segue: Recém-nascido - 0 anos (n = 12); Crianças - 6 - 10 anos (n = 23); Adolescente - 11 - 20 anos (n = 22); Adultos 21-50 - (n = 80); Meia-Idade - 51 - 60 (n = 22); Idosos - 61-85 (n = 22).

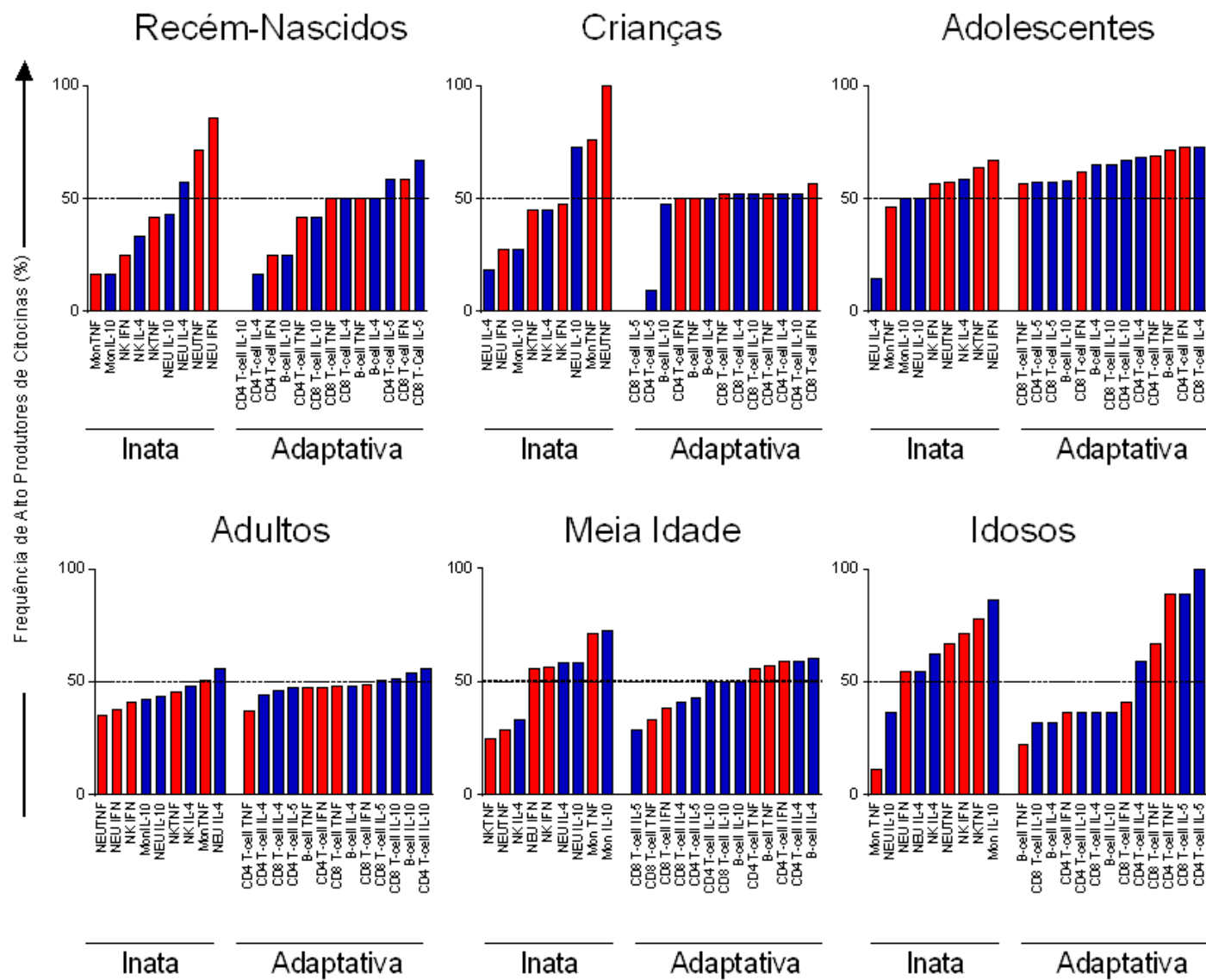


Figura 8: Assinatura de altas frequências de células produtoras de citocinas nos compartimentos imune inata e adaptativa em faixas etárias, como segue: Recém-nascido - 0 anos (n = 12); Crianças - 6 - 10 anos (n = 23); Adolescente - 11 - 20 anos (n = 22); Adultos 21-50 - (n = 80); Meia-Idade - 51 - 60 (n = 22); Idosos - 61-85 (n = 22). As barras representam a frequência ascendente dos altos produtores de citocinas na imunidade inata e adaptativa de cada grupo etário. As barras vermelhas representam células com alta produção de citocinas inflamatórias e as barras azuis representam células com alta produção de citocinas reguladoras. A linha pontilhada representa o percentil 50 que foi usado como um ponto de corte para identificar aumentos relevantes.

Impacto da presença de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) no perfil imunológico e na composição da microbiota intestinal e.

Na população 2 discriminamos, entre os sujeitos selecionados como saudáveis pelos critérios mencionados anteriormente, indivíduos portadores de uma doença associada com a idade (Hipertensão Arterial Sistêmica – HAS) altamente prevalente (Brasil, 2012) e avaliamos o impacto da presença de HAS na produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e na composição da microbiota intestinal.

Oitenta indivíduos foram recrutados (21 homens e 59 mulheres) com idade entre 26 a 87 anos. Essa população foi categorizada pela presença ou ausência de HAS. Os dados analisados referem-se à HAS previamente diagnosticada por médico e uso de medicações anti-hipertensivas prescritas (consideradas variáveis categorizada em sim ou não). Quarenta e oito indivíduos tinham HAS enquanto 32 não tinham e foram usados como grupo controle. Não houve diferenças em idade ou gênero entre os grupos HAS e controle. Os dados demográficos e de saúde estão resumidos na **Tabela 2**.

Tabela 2: Dados demográficos e de saúde dos indivíduos da Casa UNIMED em Governador Valadares, categorizados pela presença de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS)*

Dados	População	Controle	HAS
N.	80	32	48
Gênero			
Homens	21	7	14
Mulheres	59	25	34
Idade (média ± Desvio Padrão)	64.5 ± 15.3	63.3 ± 15.0	65.3 ± 15.5
Faixa etária	26 to 87	28 to 86	26 to 87
Exame Parasitológico			
<i>Schistosoma sp.</i>	0	0	0

*Hipertensão arterial sistêmica em indivíduos que referem diagnóstico médico de hipertensão arterial e o uso de medicamentos anti-hipertensivos durante a aplicação de questionário (Anexo 2).

Indivíduos hipertensos apresentam um perfil inflamatório de citocinas

Com o objetivo de avaliar se indivíduos hipertensos apresentavam um padrão imunológico distinto de produção de citocinas comparado aos indivíduos controle, foi utilizado o ensaio citofluorimétrico com microesferas fluorescentes (cytometric bead array - CBA) para medir a produção de IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 em sobrenadantes de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Considerando que as citocinas IL-2 e IL-4 tiveram dosagens muito baixas (mediana 0), ambas foram retiradas das análises.

A produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-17A, IL-6 e IL-10 foi comparada entre os grupos hipertensos e normotensos, entretanto não houve diferenças significativas entre os grupos (**Figura 9**). Foram realizadas, então, razões entre as citocinas. Esse tipo de análise é comumente usada em estudos imunológicos por criar uma medida de balanço entre os perfis das citocinas avaliadas. Observamos um aumento na razão TNF/IFN- γ no grupo HAS comparado ao controle ($p=0,0264$), devido a uma tendência de aumento de ambas citocinas TNF e IFN- γ nos indivíduos hipertensos. Não houve diferenças nas demais razões (**Figura 9**)

Para analisar com mais detalhe a contribuição dessas citocinas para o perfil imunológico dos grupos estudados, a assinatura ascendente de indivíduos com altas frequências de células produtoras de citocinas do grupo HAS e Controle foram comparadas, considerando relevante quando 50% ou mais indivíduos do grupo tiveram frequências altas de células produtoras de determinada citocinas. Sendo assim, uma produção relevante foi encontrada para TNF- α e IL-6 no grupo HAS, enquanto que, no grupo controle normotenso, nenhuma citocina foi altamente produzida por mais de 50% dos indivíduos (**Figura 10**). Tais resultados sugerem um perfil inflamatório geral associado à presença de HAS.

Considerando a hipótese sugerida no resultado anterior de que um perfil inflamatório de citocinas está presente em indivíduos hipertensos, avaliou-se o escore inflamatório desses indivíduos baseado nas citocinas inflamatórias avaliadas IFN- γ , IL-17A, TNF e IL-6. O escore (vide Métodos) foi calculado para cada indivíduo separadamente e foi gerada uma percentagem de indivíduos com

cada escore em cada grupo. Indivíduos com escores 3 ou 4 foram considerados inflamados e aqueles com escores 0 ou 1 foram considerados não inflamados. Dos indivíduos hipertensos, 50% tinham escore 3 ou 4, enquanto que, no grupo controle normotenso, a frequência do escore inflamatório foi de 44%.

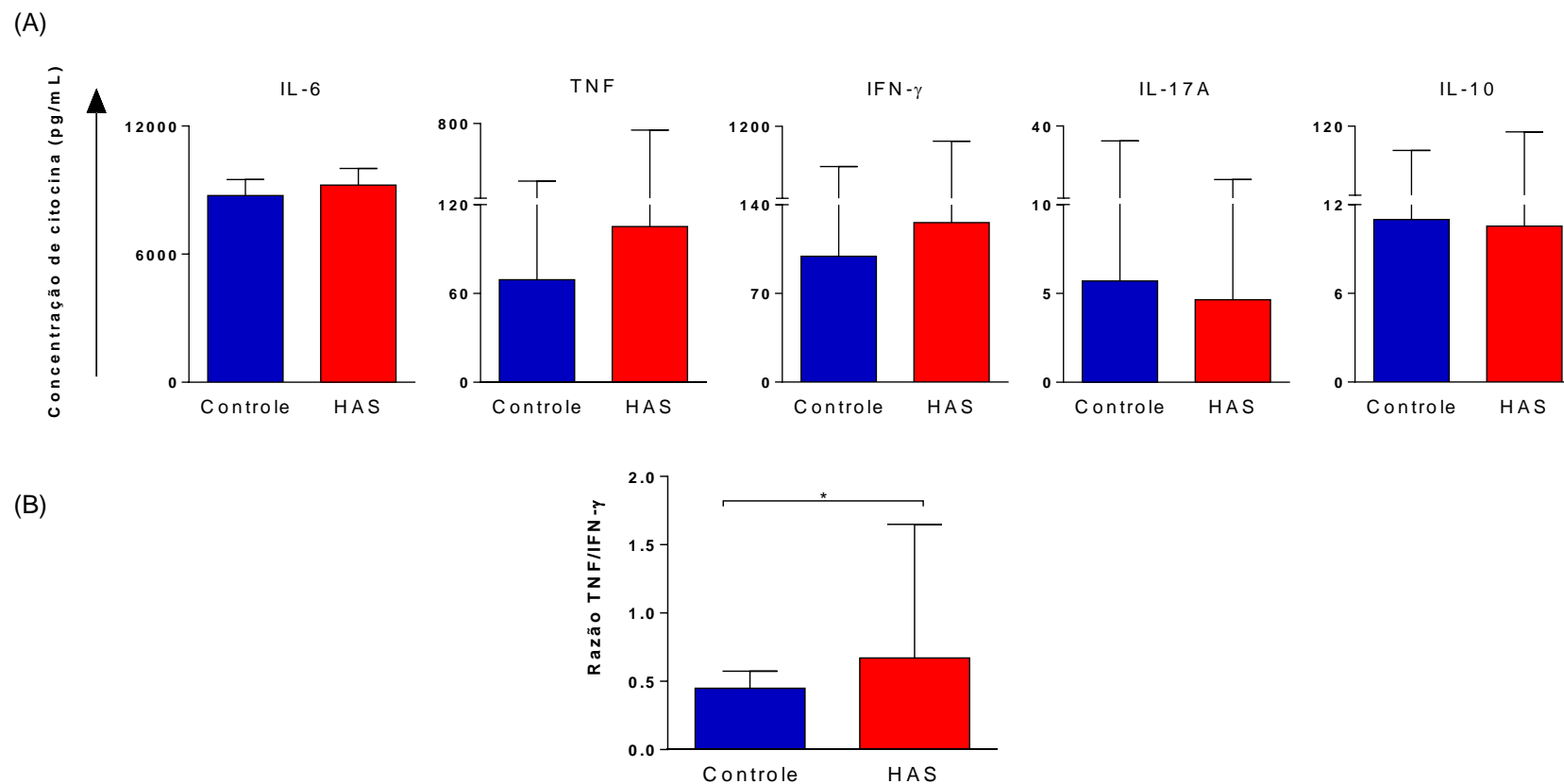


Figura 9: Comparação de produção de citocinas em sobrenadante de PBMC, avaliada por citometria de fluxo, entre os grupos Hipertenso (HAS) e Normotenso (Controle). A. As barras representam a concentração das citocinas (pg/mL) para cada grupo de estudo. B. As barras representam a razão entre as concentrações de TNF e IFN- γ . Diferenças significativas foram avaliadas pelo teste Mann-Whitney U. O Asterisco (*) representa diferenças significativas com $p < 0,05$.

Controle

HAS

Citocinas

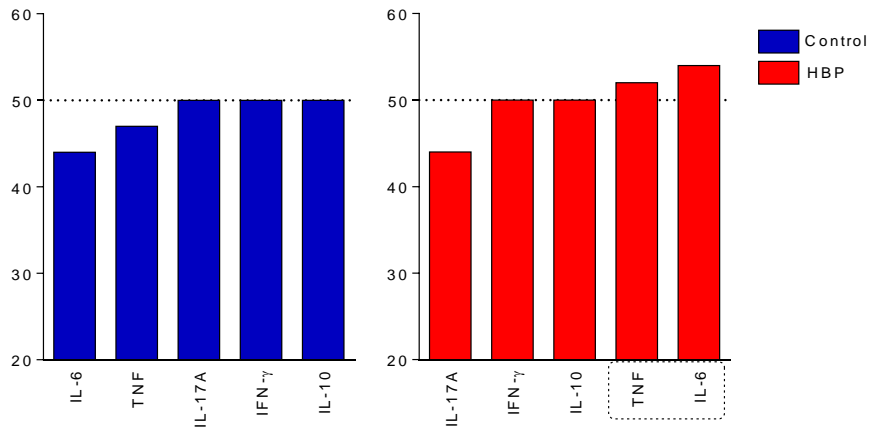
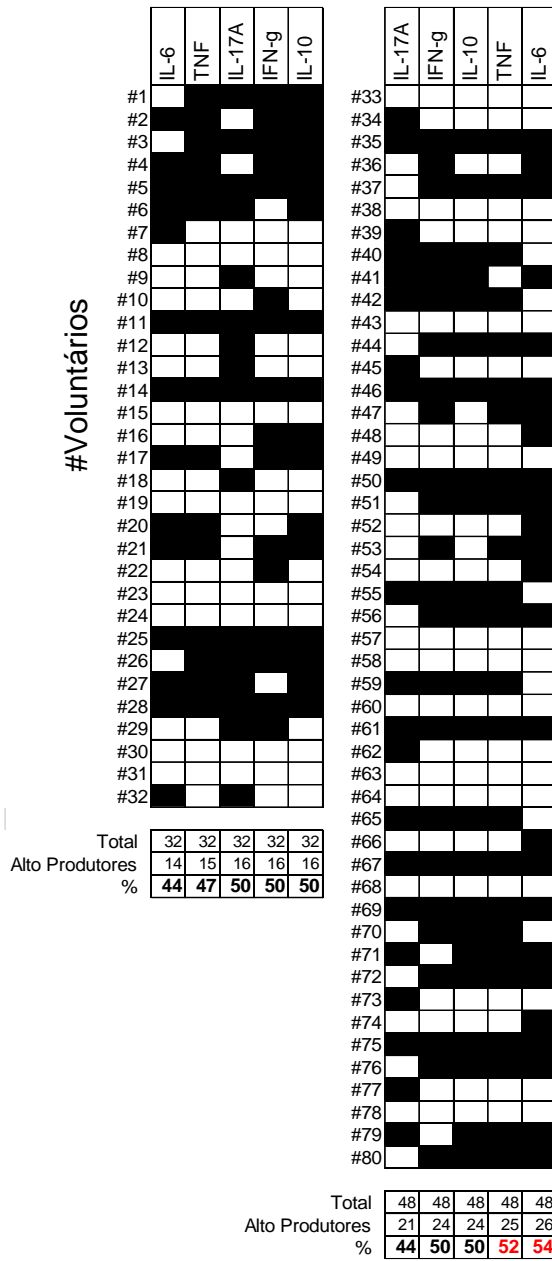


Figura 10: Assinatura de citocinas produzidas por PMBC de indivíduos Hipertensos e Normotensos. **A.** Diagrama de cores representando a porcentagem de indivíduos (Controle n=32; HAS n=48) com níveis altos (■) e baixos (□) de citocinas medidas no sobrenadante de cultura de PBMC sem estímulo. **B.** Curva ascendente da porcentagem de indivíduos com alta produção de citocinas nos grupos Controle e Hipertenso. Produção relevante de uma dada citocina é considerada quando mais de 50% dos indivíduos apresenta alta produção de citocina, que é destacada pelo quadrado pontilhado.

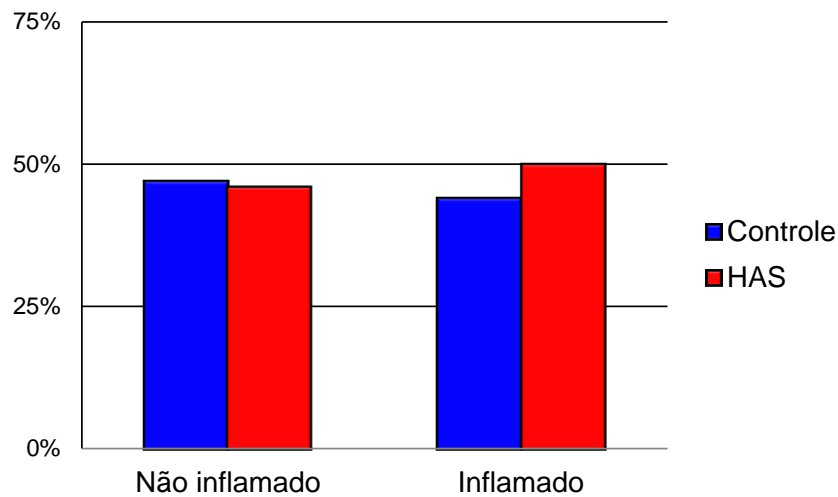


Figura 11: Escore inflamatório em relação a Hipertensão Arterial Sistêmica. As barras representam a frequência de indivíduos em cada grupo de estudo que foram categorizados como “não inflamados” (soma dos escores 0 e 1) ou como “inflamados” (soma dos escores 3 e 4).

Análise da composição da microbiota intestinal em indivíduos hipertensos

Para uma análise mais complexa de marcadores biológicos de indivíduos com Hipertensão Arterial Sistêmica e considerando que a disbiose da microbiota intestinal vem sendo relacionada a diversos estados patológicos, a composição da microbiota intestinal foi avaliada nos indivíduos Hipertensos e Controles da População 2.

A diversidade da microbiota intestinal estava alterada em indivíduos hipertensos.

Amostras de fezes foram coletadas de 80 indivíduos recrutados na Casa UNIMED em Governador Valadares, e a região V3-V4 do DNA ribossomal 16S (rDNA) foi sequenciado. Um total de 3.790.002 de leituras de alta qualidade foram obtidas e analisadas (média por indivíduo: 47.375; Faixa, 3.745-150.790). As leituras foram divididas em 24.575 *operational taxonomic units* (OTUs). O índice de cobertura da análise foi de 97%, mostrando que o número de sequências obtido foi suficiente para a conclusão dos resultados. Isto indica que a amostra foi suficiente para representar a diversidade da comunidade observada, em cada par de iniciador e em todas as suas reações, não sendo necessário o aumento de material para análise.

As curvas de rarefação (que considera o maior número de leituras obtidas ao alcançar o *plateau* de sequências analisadas) foram obtidas em várias metodologias incluindo diversidade filogenética, espécies observadas, Chao1 index de riqueza microbiana e o Shannon index para biodiversidade, com o nível de saturação após 3.000 leituras. Com essas metodologias, pode-se, então, avaliar a diversidade alfa dos grupos de estudo. Foi interessante observar que, pelo índice de Shannon, hipertensos apresentam uma menor diversidade alfa quando comparados aos controles normotensos ($p= 0,0483$). Não houve diferenças nas outras medidas de diversidade (**Figura 12**)

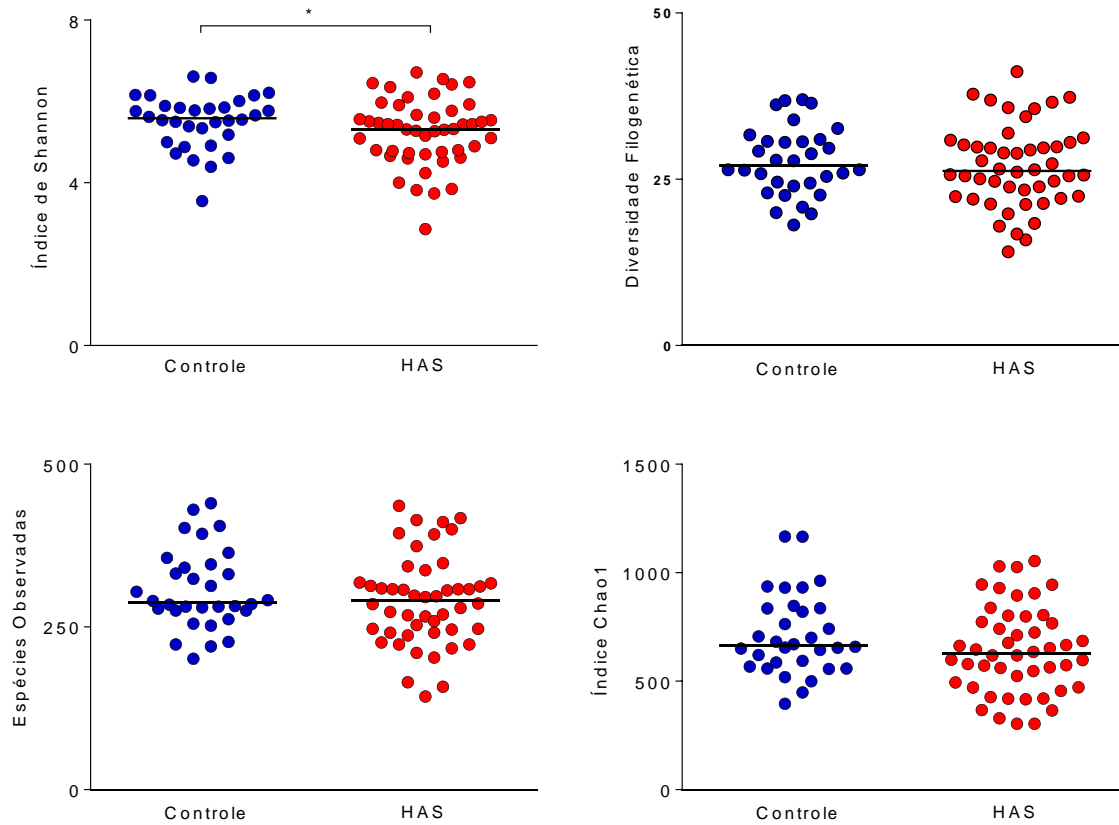


Figura 12: Comparação da estrutura microbiana intestinal entre indivíduos hipertensos e normotensos. A diversidade alfa foi calculada de acordo com os seguintes índices: Índice de diversidade de Shannon, diversidade filogenética (PD), Espécies observadas e Índice de diversidade microbiana de Chao1 em cada grupo. Cada ponto no gráfico representa a diversidade alfa de um indivíduo. Os asteriscos indicam significância estatística (teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Indivíduos hipertensos apresentaram uma microbiota intestinal em disbiose

Em adultos saudáveis, 80% da microbiota identificada pode ser classificada em quatro filos dominantes: Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria. Sendo assim, comparou-se a abundância relativa dos filos presentes em maior proporção. Observou-se uma significativa redução do Filo Bacteroidetes no grupo hipertenso (Tabela 3).

Tabela 3: Composição da microbiota intestinal ao nível de Filos em indivíduos hipertensos (HAS) e normotensos (Controle)

Abundância Relativa			
Filo	Controle	HAS	valor de p
Firmicutes	79,1	75,75	0.22
Bacteroidetes	8,97	4,96	0.033*
Actinobacteria	3,61	5,15	0.58
Proteobacteria	5,42	8,52	0.35

*Diferença significativa pelo teste Mann-Whitney.

Essa redução de Bacteroidetes resultou em um aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) em hipertensos ($p= 0,0343$), apresentado na **figura 13**, o que é amplamente reconhecido como uma assinatura de disbiose da microbiota (Mariat et al 2009; Sanz e Moya-Pérez 2014; Yang et al 2015).

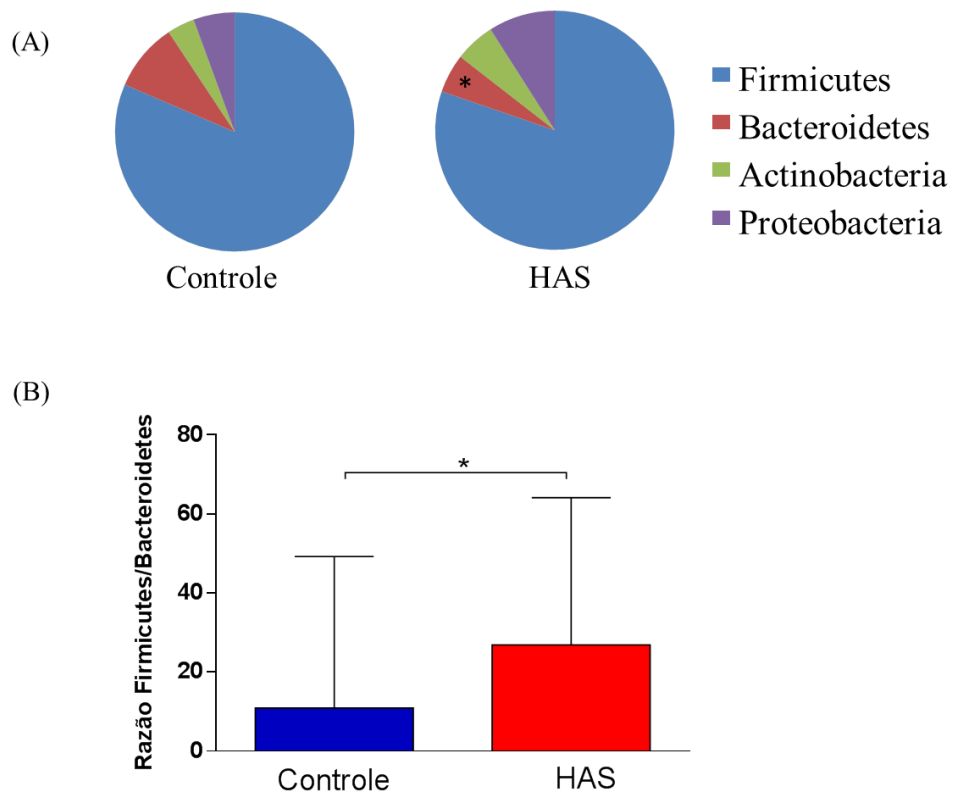


Figura 13: Composição da microbiota intestinal ao nível de filos em indivíduos hipertensos (HAS) e normotensos (Controle) **A.** Gráfico de pizza resumindo a abundância relativa dos 4 filos mais abundantes nos grupos HAS e Controle **B.** A razão Firmicutes/Bacteroidetes foi calculada como um biomarcador de disbiose da microbiota intestinal. Asterisco (*) representa diferenças significativas no teste Mann-Whitney U (A. $p= 0,033$ e B. $p= 0,0343$).

Indivíduos hipertensos apresentaram composição microbiana distinta no nível de família e gênero

A análise por distância *weighted UniFrac* ($p=0.04$; Figure 14) foi capaz de segregar, através da composição da comunidade microbiana, os grupos HAS e Controle. Especificamente, o eixo do Componente Principal 1 (PCo1), que contribuiu com 43% da variabilidade total dos dados, foi negativamente associado com a presença de HAS ($p=0.03$). Para identificar as famílias e gêneros bacterianos responsáveis por essa separação entre a estrutura da microbiota dos grupos HAS e Controle, vetores de abundância relativa com uma contribuição significativa foram identificados e sobrepostos no espaço de ordenação com as análises de distâncias *weighted UniFrac* (**Figura 14**). Curiosamente, os grupos microbianos que significativamente conduziram o padrão de agrupamento foram os bem conhecidos produtores de butirato da família Lachnospiraceae, incluindo *Roseburia*, *Coprococcus*, estando esses grupos microbianos significativamente diminuídos em Hipertensos ($p < 0,05$; **Figura 15**).

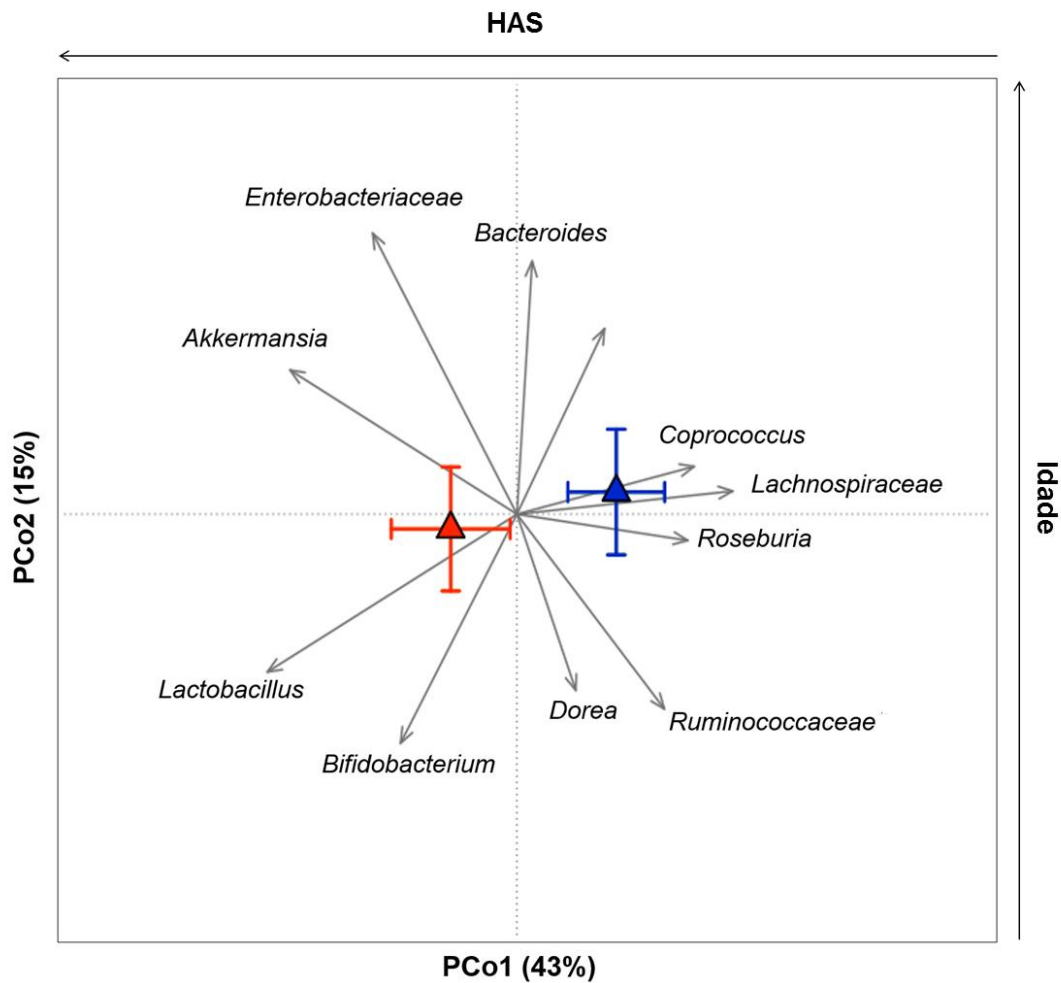


Figura 14: Análise de Coordenadas Principais das distâncias *UniFrac* ponderadas (*Weighted*) para indivíduos hipertensos e normotensos. Os dois componentes explicam 43% e 15% da variância, respectivamente. Uma separação significativa foi encontrada entre os dois grupos ($p = 0,04$). O triângulo vermelho representa a direção da segregação do grupo HAS ($n = 48$); o azul representa o grupo controle ($n = 32$).

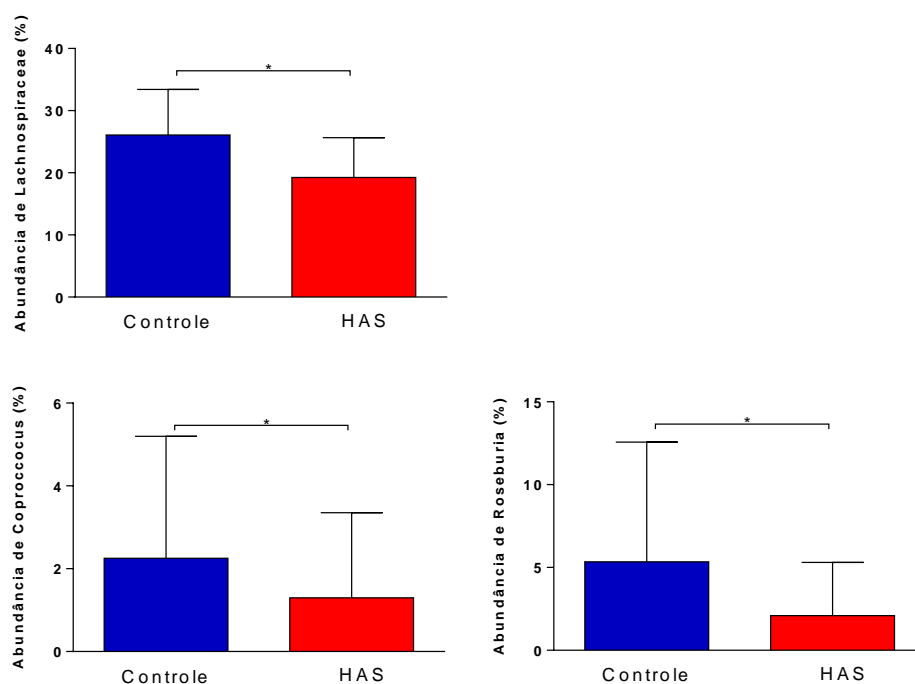


Figura 15: Comparação da abundância relativa da família Lachnospiraceae e de grupos microbianos pertencentes a essa família: Coprococcus e Roseburia. As barras representam a abundância relativa. Asterisco (*) representa diferenças significativas no teste Mann-Whitney U (Respectivamente: $p=0,023$; $p=0,044$; $p=0,0033$).

A disbiose da microbiota em indivíduos hipertensos ocorreu independentemente da idade e da dieta consumida

Dada a ampla faixa etária dos voluntários, abrangendo adultos jovens e idosos, investigou-se também o impacto da idade sobre a composição da microbiota intestinal em nossa coorte estudo. De acordo com ambas as distâncias *weighted* e *unweighted UniFrac*, nenhuma evidência de uma divergência relacionada com a idade na estrutura da microbiota de indivíduos hipertensos e normotensos foi encontrada, sugerindo que a disbiose microbiana intestinal em HAS é independente da idade (dados não mostrados). Vale ressaltar que a

idade corresponde ao segundo eixo da análise *weighted UniFrac*, sendo responsável por somente 15% da variabilidade total, contra 43% da hipertensão, sugerindo que essa segregação entre os grupos se deve em maior proporção à presença de hipertensão arterial sistêmica (**Figura 14**).

Em paralelo, notou-se características na distribuição de grupos bacterianos no eixo PCo2. Em indivíduos mais velhos, ocorre um aumento de abundâncias relativas de grupos bacterianos, incluindo *Oscillospira* e especialmente *Enterobacteriaceae* (geralmente relacionada a um perfil inflamatório, (Stecher et al 2012; 2013; Zemanick et al 2015). Por outro lado, como esperado, idades menores foram associadas com quantidades crescentes de bifidobactérias. Microorganismos conhecidos como promotores da saúde (Picardet al, 2005; Jia et al, 2008; Ventura et al 2009; Fukuda et al 2011), juntamente com membros da microbiota intestinal produtores de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), em particular *Dorea* e *Ruminococcaceae*.

Ao avaliarmos a dieta consumida por indivíduos de ambos os grupos, não notamos distinções quanto à proporção de macronutrientes ingeridos (**Tabela 4**) e nem quanto à ingestão de fibra (**Figura 16**)

Tabela 4: Percentagem de macronutrientes ingeridos por indivíduos dos grupos hipertenso (HAS) e do grupo normotenso (controle).

Macronutrientes Ingeridos			
	Proteína	Lipídeos	Carboidratos
Total	19%	28%	53%
Controle	17%	26%	57%
HAS	19%	29%	51%

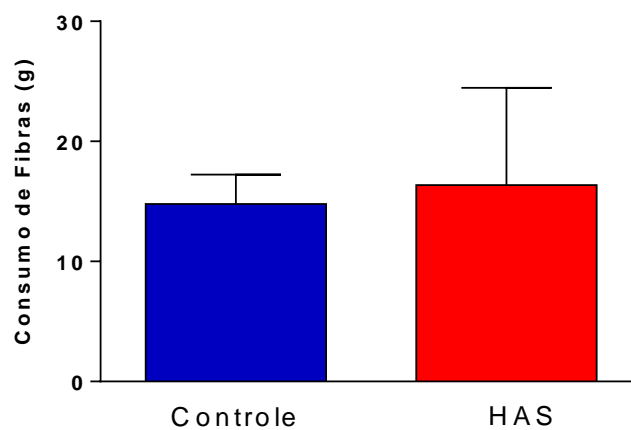


Figura 16: Quantidade calculada de fibras consumidas por indivíduos normotensos e hipertensos. Essa quantidade foi calculada com base em diário de frequência alimentar preenchido pelos voluntários.

DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento afeta toda fisiologia do organismo, resultando em alterações em atividades biológicas em níveis moleculares, celulares e sistêmicos. Tais mudanças fisiológicas relacionadas à idade podem ser muito bem exemplificadas pelas alterações ocorridas no sistema imune durante o envelhecimento, um processo conhecido como "imunossenescência".

Uma característica descrita como associada ao fenômeno natural de imunossenescência é a inflamação crônica e de baixa intensidade, denominada *inflamm-aging* (Cossarizza et al 1997; Franceschi et al 2000a; Fülöp et al 2016). O conceito de *inflamm-aging* sugere que a produção de mediadores inflamatórios, especialmente as citocinas, aumenta com a idade. No entanto, observou-se, no estudo de centenários europeus, que nem todos envelhecem com um padrão idêntico de inflamação crônica (*inflamm-aging*). Pelo contrário, os centenários considerados "saudáveis" apresentam, juntamente com as alterações em mediadores inflamatórios, mecanismos de regulação da inflamação sistêmica. Assim, em paralelo ao fenômeno nomeado de *inflamm-aging*, ocorre, nesses indivíduos saudáveis, um processo de "remodelamento" do sistema imune (Franceschi et al.1995; Paolisso et al.2000). Para os autores de ambos os termos, o conceito de remodelamento bem-sucedido do sistema imune humano seria a base do "envelhecimento saudável". Esses autores sugerem que a imunossenescência é o resultado líquido da adaptação contínua do corpo às alterações e deteriorações que ocorrem ao longo do tempo. Como tais recursos corporais são continuamente otimizados, a imunossenescência saudável deve ser considerada um processo altamente dinâmico que inclui tanto perdas como ganhos de função imunológica.

Nesse estudo, notou-se que a produção de citocinas por subtipos de leucócitos apresenta variações relacionadas com a idade dos indivíduos podendo ser, então, consideradas como desafios imunológicos que enfrentamos com o decorrer da vida. Observou-se que o envelhecimento (em indivíduos selecionados como “saudáveis”) não foi associado a um declínio progressivo na produção de citocinas por todos os subtipos de leucócitos, mas foi caracterizado por flutuações nas frequências de células produtoras de citocinas em vários pontos durante a vida. Além disso, essas variações foram distintas em cada população de células examinada.

O número de estudos nessa área é pequeno e os resultados são muitas vezes contraditórios. É difícil comparar dados entre os vários estudos, devido a diferenças nos desenhos experimentais (Gardner e Murasko 2002). De acordo com alguns estudos, um aumento do nível de citocinas plasmáticas, em particular de citocinas pró-inflamatórias e seus receptores solúveis, ocorre com envelhecimento (Gerli et al 2000; Franceschi et al 2000b; Bruunsgaard et al 2003). Nesse contexto, deve-se ter em mente que a produção da maior parte das citocinas não se limita a um tipo celular e, portanto, é difícil identificar as fontes que contribuem para seus níveis plasmáticos (Zanni et al 2003; Franceschi et al 2005; Testa et al 2006)

Com o objetivo de caracterizar melhor a fonte de produção de citocinas nos grupos estudados, optou-se pela técnica de marcação de citocinas intracitoplasmáticas e imunofenotipagem de leucócitos produtores dessas citocinas. A técnica de marcação de citocinas intracelulares (Collins et al 1998) oferece a possibilidade de avaliar a contribuição das diferentes células para a produção de citocina em populações de células heterogêneas. Assim, foi possível medir citocinas intracelulares e marcadores de superfície celular simultaneamente com o objetivo de identificar as sub-populações específicas de leucócitos

humanos que produzem um padrão de citocinas e caracterizar a sua produção (Jung et al 1993; Prussin 1997; Prussin e Metcalfe 1995; Rostaing 1999; Moreira 2015; Silveira 2015)

Avaliou-se o perfil de citocinas de células imunes adaptativas (células T CD4, células T CD8 e células B), considerando-se que esse braço do sistema imune é especialmente atingido durante o envelhecimento. Como esperado, algumas citocinas, tais como IL-10 produzidas por células T diminuí com a idade. No entanto, a produção de TNF e IFN-gama pelas células T CD4 e IL-5 por células T CD4 e CD8 não foram afetadas. Nosso grupo demonstrou anteriormente que mudanças nas frequências de células T durante o envelhecimento tendem a formar uma curva, com frequências máximas no início da idade adulta (19-40 anos) e decrescente até idade avançada. Isto foi particularmente observado para as células T CD4. Em contraste, a frequência de células T CD8 é preservada durante o envelhecimento e diminuiu apenas nas faixas etárias de 41 a 75 anos de idade (Faria et al 2008). Os resultados obtidos a partir da análise de 47 indivíduos europeus de diferentes idades envolvidas no estudo de Alberti e colaboradores (2006) indicaram que a percentagem de células T CD4 IFN- γ + diminuiu significativamente em células virgens tanto em indivíduos idosos (mais que 60 anos) quanto em nonagenários em comparação com indivíduos jovens, enquanto que a percentagem de células T CD4 produtoras de TNF- α diminuiu significativamente em células ativadas/memória de indivíduos idosos em comparação com os jovens. Diferenças na metodologia e na idade limite dos participantes dos estudos podem explicar esses resultados distintos.

Sob a perspectiva evolucionária, o sistema imune passa, durante a vida, por estresses antigênicos (Ottaviani e Franceschi, 1997), de maneira que a imunossenescência é a consequência desse atrito contínuo causado pela carga antigênica crônica. O estresse antigênico, por sua vez, origina senescência replicativa das células imunes, a expansão periférica de linfócitos gerando oligoclonalidade no seu repertório e a redução do espaço

imunológico. Associada à atrofia tímica, essas modificações geram redução das células T virgens e também de células T produtoras de determinadas citocinas com o aumento paralelo de células T de memória, tornando a produção de citocinas menos resiliente já que as células de memória são células já diferenciadas que, por isto, não são capazes de reagir a novos estímulos e mudar seu padrão de secreção (Franceschi et al 1999; Alberti et al 2006; Muller and Pawelec 2014)

No entanto, as alterações imunológicas associadas ao envelhecimento não estão limitadas às células T. Células B produtoras de TNF e de IL-10 também apresentam uma redução nessa produção em indivíduos idosos (Franceschi et al 1996; Olsson et al 2000; Potestio et al 1999). Nosso grupo tem observado que as frequências de células B diminuem em indivíduos brasileiros com 19 a 40 anos de idade e esses dados são compatíveis com o menor percentual de células B produtoras de citocinas em adultos (Faria et al 2008).

Embora as modificações nas funções das células T e B tenham sido identificadas em idosos saudáveis, as respostas imunes inatas parecem ser mais resistentes às alterações (Cossarizza et al 1997) associadas à idade. Células NK são um dos mediadores celulares da defesa inata e essa população celular tem sido extensivamente estudada nos idosos. A atividade, o número e a capacidade citotóxica de células NK estão aumentadas em indivíduos idosos saudáveis e centenários. Além disso, evidências acumuladas nas últimas duas décadas apoiam a importância da atividade de células NK na manutenção da boa saúde durante o envelhecimento. Isto é consistente com a bem preservada citotoxicidade das células NK em centenários considerados saudáveis por critérios tais como aptidão física, independência para realizar atividades diárias e função cognitiva preservada (Solana et al 2006; Sansoni et al 1993; Solana et al 1999; Solana e Mariani 2000). Nosso grupo relatou um aumento significativo na frequência de células NK CD16+ IFN- γ + em indivíduos não infectados residentes em áreas endêmicas do Brasil para

Schistosoma mansoni. Essas células se mantêm em maior frequência em indivíduos com mais de 70 anos de idade que são resistentes à infecção. Como a produção de IFN- γ por células T CD4 em indivíduos adultos jovens tem sido relatada como importante para a resistência à infecção pelo *S. mansoni*, em áreas endêmicas, a preservação, em indivíduos idosos, de células capazes de manter a produção de IFN- γ durante o declínio funcional de células T CD4 seria um fator importante associado à manutenção da saúde. Assim, os indivíduos saudáveis (que permanecem não infectados na área endêmica) são aqueles que sustentam uma elevada frequência de células NK produtoras de IFN- γ durante o envelhecimento (Speziali et al 2004). Em conformidade com isso, nossos resultados neste estudo demonstraram uma maior frequência de células NK produtoras de citocinas do tipo 1 (IFN- γ) nos idosos saudáveis selecionados, sendo que esse aumento foi balanceado por um aumento paralelo de células NK produtoras de citocinas do tipo 2 (IL-4).

Outras células do sistema imune inato podem também ser importantes no processo de imunossenescência saudável. Componentes celulares do sistema imune inato, incluindo os neutrófilos e macrófagos, são os primeiros a chegar ao local da lesão. A função dessas células é iniciar uma resposta inflamatória, fagocitar o agente patogênico (no caso de infecção), recrutar células NK, facilitar a maturação e a migração de células dendríticas (DC) que controlam a natureza das respostas mediadas por células T (Solana et al 2006). No presente estudo, observamos que as frequências de neutrófilos produtores de TNF, IFN- γ e IL-4 diminuíram desde o nascimento até a idade adulta, se mantendo depois estáveis até a senescência. Por outro lado, a frequência de monócitos produtores de TNF aumentou do nascimento à infância, quando alcançou um *plateau* que se mantém por toda a vida, diminuindo apenas na senescência.

A observação mencionada anteriormente da capacidade de células NK compensarem a baixa produção de IFN- γ em indivíduos idosos saudáveis (Speziali et al

2004) teve um paralelo importante neste estudo. Observamos que a frequência reduzida de células da imunidade adaptativa (linfócitos T e B) produtores de IL-10 foi compensada, nos idosos saudáveis, por frequências aumentadas de células da imunidade inata (neutrófilos e monócitos) produtoras de IL-10.

A produção de citocinas e suas fontes não devem ser avaliadas isoladamente durante um processo complexo como a imunossenescência. A resposta imune é o resultado de vários eventos que envolvem o recrutamento de células, produção de citocinas e fatores quimiotáticos e o estabelecimento de uma resposta imunorreguladora capaz de controlar os fatores pró-inflamatórios. Neste contexto, foi realizado um perfil de de várias citocinas (pró-inflamatórias e reguladoras) para avaliar o padrão global da resposta imune durante o envelhecimento. Essa estratégia de análise global de citocinas tem sido utilizada pelo nosso grupo em trabalhos anteriores (Luiza-Silva et al 2011) e foi utilizada como ferramenta para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações imunológicas associadas ao envelhecimento.

Outro aspecto importante deste estudo foi a inclusão de um grupo de crianças e de neonatos. A infância representa um período crítico do desenvolvimento imunológico e os dados sobre as distribuições de parâmetros imunes em crianças saudáveis são muito precários ainda. Neste estudo, demonstramos que os recém-nascidos apresentaram uma frequência elevada de células T produtoras de IL-5, enquanto que neutrófilos produtores de citocinas do tipo 1 (TNF e IFN- γ) predominaram no compartimento imune inato, um perfil que permaneceu constante em crianças. O padrão de produção de citocinas da gestação e, posteriormente, do recém-nascido se caracteriza por uma predominância de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-13) e de citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β). Essas citocinas, juntamente com outros fatores anti-inflamatórios, são críticos para a tolerância imunológica que a mãe desenvolve aos antígenos do filho durante a gravidez e tornam o recém-nascido

mais suscetível à indução de tolerância a antígenos alimentares em um período de imaturidade imunológica (Verhasselt 2010). A exposição a uma quantidade cada vez mais diversificada de antígenos ambientais durante os primeiros anos de vida poderia ser responsável pelo aumento de respostas do tipo 1 observada na infância (Prescott et al 1999; Tulic 2011). Essas alterações parecem promover um perfil imunológico saudável, considerando que uma falha na produção de citocinas do tipo 1 e na supressão de respostas do tipo 2 exacerbadas durante a infância são características de indivíduos propensos a doenças atópicas (Yabuhara et al 1997; Prescott et al 1999; Tulic 2011)

Adolescentes (11 a 20 anos) apresentaram um perfil imunológico caracterizado por frequências equilibradas de células adaptativas capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias/reguladoras. Faz sentido supor que a exposição adequada aos antígenos ambientais durante a infância e o aumento dos hormônios sexuais poderiam explicar essa mudança para perfil imunológico robusto e equilibrado caracterizado por uma contribuição predominante de células imunes adaptativas produtoras de citocinas em adolescentes.

O mecanismo pela qual o sistema imune regula e é regulado por hormônios não é muito claro, mas há evidências de que o sistema imune interage com vários sistemas do nosso corpo, incluindo o endócrino e reprodutor. A diferença nas concentrações e no tipo de hormonas sexuais durante a vida traz alterações no resultado de capacidade de resposta imunológica (Grossman 1989; Berczi e Nagy 1998; Yamaguchi et al 2001; Bhatia et al 2014). Hormônios sexuais influenciam o sistema imune, aumentando o número de células imunes circulantes e afetando tanto a proliferação quanto a apoptose dessas células (Eidinger e Garrett, 1972; Greene et al 1984; Banchereau et al 2000; Mor et al, 2003; Bhatia et al 2014).

Em nosso estudo, observamos que o sistema imune atinge o equilíbrio em idade adulta, quando o perfil de citocinas foi caracterizado por um equilíbrio entre os compartimentos inato e adaptativo, e entre as citocinas inflamatórias e reguladoras. Observando a produção global de citocinas em indivíduos a partir da faixa etária 25 a 51 anos (grupo Meia Idade), pode-se notar a contribuição na produção de citocinas por células imunes adaptativas e a expansão da contribuição do compartimento imune inato nesse perfil de citocinas. É amplamente aceito que as células T são especialmente alvo de alterações durante a imunossenescência. Um número de fatores tem sido associado à diminuição da função das células T com o envelhecimento. A atrofia tímica com a consequente redução na produção de células T virgens por esse órgão linfóide e o desenvolvimento de um repertório oligoclonal de células T de memória são de particular importância (Malaguarnera et al 2001; Pawelec e Solana 2001; Pawelec et al 2002; Akbar et al 2005)

Com o passar da vida, ocorrem grandes alterações imunológicas, dentre as mais importantes estão a redução do número de células B e T virgens e aumento das células de memória em indivíduos idosos. Com essas alterações fenotípicas em células imunes, a rede de produção de citocinas também se encontra alterada (Fulop et al 2004; Alberti et al 2006; Pawelec et al 2014).

Curiosamente, em todas as análises realizadas, os indivíduos do grupo Idoso apresentaram um perfil equilibrado de produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, com uma contribuição de destaque de células imunes inatas para esse equilíbrio. Esses dados, coletados em indivíduos considerados saudáveis, mostram que a imunossenescência saudável é o resultado da adaptação contínua do corpo às alterações deletérias que ocorrem ao longo do tempo. Segundo essa hipótese, os recursos corporais são continuamente otimizados e a imunossenescência de sucesso deve ser considerada

um processo muito dinâmico de remodelamento (Pawelec et al 2002). Nossos resultados suportam essa hipótese e mostraram que compartimentos imunes são remodelados durante o envelhecimento saudável para alcançar o equilíbrio

Existem alguns protocolos padronizados capazes de separar os indivíduos idosos saudáveis daqueles portadores de doenças desabilitantes. Um dos mais conhecidos é o protocolo SENIEUR criado por Ligthart e colaboradores em 1984 (Litghart et al 1984). A criação desses critérios foi, de início, importante por separar o processo do envelhecimento das doenças associadas a ele. No entanto, os critérios extremamente rígidos (envolvendo exames clínicos e bioquímicos) para que os indivíduos fossem classificados como saudáveis deu origem a várias críticas sobre a sua utilização. A principal delas é que ele faria uma separação de indivíduos excepcionais cujo estudo traria informações sobre o envelhecimento ideal, mas inalcançável para a maioria da população (Litghart 2001). Dentro da polêmica criada pelo protocolo SENIEUR, outros critérios foram propostos e mais recentemente o grupo de Moraes e colaboradores (Moraes et al 2016) descreveu uma classificação extremamente realista e útil de graus de vitalidade versus fragilidade para ser empregada na avaliação do envelhecimento humano. De acordo com esse novo critério, o idoso saudável seria aquele que conseguisse desenvolver suas atividades cotidianas com “independência” e “autonomia”. Dentro dessa categoria mais ampla de envelhecimento saudável, estariam indivíduos com pequenas alterações ou até com doenças crônicas desde que sob controle e que não comprometessem suas atividades principais. Além de criar uma meta mais realista para o envelhecimento saudável, esse novo critério de classificação permite que se localize em uma escala de 1 a 10 (de vitalidade) aqueles indivíduos que se encontram na fronteira entre o envelhecimento saudável e a fragilidade (comprometimento funcional). Foi esse critério de classificação que utilizamos neste estudo. E um dos objetivos da nossa avaliação foi examinar exatamente, dentro da nossa

amostra de indivíduos saudáveis, aqueles que teriam uma doença associada ao envelhecimento que ainda que estivesse sob controle e não implicasse em comprometimento funcional dos indivíduos, pudesse ser um fator de desequilíbrio na vitalidade desses indivíduos. Escolhemos a hipertensão arterial sistêmica (HAS) por ser uma condição ligada diretamente ao envelhecimento e extremamente prevalente no Brasil e no mundo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que dos 75% dos indivíduos que sobrevivem aos 70 anos, 1/3 deles será portador de doenças crônicas e pelo menos 20% terão algum grau de incapacidade associada. Dentro dos objetivos mencionados acima, decidimos avaliar parâmetros biológicos em indivíduos de várias faixas etárias na presença e ausência de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS). A HAS foi avaliada como relato de diagnóstico médico prévio. A presença de HAS baseada em informação auto-referida por voluntários de estudos foi considerada compatível com o diagnóstico obtido em estudos com mensuração da pressão arterial, sendo assim, um indicador apropriado da prevalência da hipertensão arterial (Lima-Costa et al 2004; Barros et al 2006; Ferreira et al 2009; Chrestani et al 2009; Nogueira et al 2010). A hipertensão auto-referida tem sido usada em diversos inquéritos de saúde, entre eles o *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), nos Estados Unidos, (NIH 1994) e a Pesquisa Nacional por Amostras de Domicílio (PNAD), no Brasil (Brasil 1998). Vargas et al (1997), diante de resultados semelhantes, destacaram o fato do indivíduo diagnosticado com HAS receber medicamento anti-hipertensivo, que é um dos parâmetros considerados na definição da presença da doença.

O estudo de dados de 54.000 indivíduos provenientes do sistema de monitoramento por inquérito telefônico, o Vigitel, no período de 2006 a 2011 mostrou prevalência de hipertensão arterial (HA) em cerca de um quarto da população, com aumento progressivo

com a idade, atingindo mais da metade da população após os 55 anos. A HAS auto-referida foi mais frequente em mulheres e em pessoas com menor escolaridade (Andrade et al 2015). Não encontramos diferenças em relação a idade e gênero entre os grupos Hipertenso e Normotenso (Controle) no nosso estudo. Diferenças metodológicas como amostragem, grupos populacionais, faixa etária, critérios diagnósticos entre outros podem explicar resultados distintos.

Um dos mecanismos biológicos que mais comumente se relaciona à hipertensão arterial é a inflamação crônica (Vasto et al, 2007; Chung et al, 2009; Cevenini et al, 2010; Singh e Newman, 2011). A inflamação é uma resposta localizada à lesão do tecido ou infecção que auxilia no reparo tecidual e/ou eliminação do agente nocivo. Classicamente caracterizada por dor, calor, vermelhidão, inchaço e perda de função, a inflamação aguda é tipicamente resolvida de modo relativamente rápido para promover a restauração da função do tecido. No entanto, com a idade, a capacidade para resolver a inflamação torna-se prejudicada levando a contínua infiltração tecidual de leucócitos e a liberação crônica de citocinas pró-inflamatórias (Sarkar e Fisher, 2006). Como resultado, o evento local inicial tem consequências sistêmicas em longo prazo. Considerando, então, tais consequências sistêmicas que ocorrem em condições crônicas, optamos por avaliar a resposta imune em sobrenadante de cultura de PBMC sem estímulo na ausência de estímulo exógeno considerando que essas condições podem refletir os eventos de produção de citocinas por leucócitos sanguíneos *in vivo*.

Recentemente tem sido realizado um esforço significativo para elucidar os mecanismos que ligam a inflamação à hipertensão e à doença cardiovascular (Ridker et al 1998; Blake et al 2003, Youn et al 2013; De Miguel et al 2016). Observamos um aumento de citocinas do tipo 1, traduzida no aumento da razão TNF/IFN- γ , em indivíduos hipertensos quando comparados aos normotensos sugerindo que a inflamação desempenha um papel

importante na hipertensão humana. Para reforçar a hipótese inflamatória, realizamos a análise de perfil ascendente que apontou para o TNF e IL-6 como as principais citocinas responsáveis pelo perfil imune de leucócitos de hipertensos e demonstramos que, do grupo de indivíduos hipertensos, 50% dos indivíduos tinham escore 3 ou 4, considerado como inflamado.

Vários outros estudos têm apoiado o conceito de que as citocinas inflamatórias produzida por leucócitos contribuem para a hipertensão. Youn e colaboradores (2013) sugeriram que linfócitos T de pacientes com hipertensão apresentam um aumento de células senescentes T CD8 citotóxicas pró-inflamatórias que perderam a expressão de CD28 e passaram a expressar CD57. Curiosamente, a perda de CD28, que ocorre no envelhecimento, está associada com uma elevada prevalência de hipertensão, sendo que tais células T CD8+ CD28- também secretam perforina, granzima B, IFN- γ e TNF. Bautista e colaboradores (2005) demonstraram que os níveis plasmáticos de mediadores inflamatórios, tais como proteína C-reativa, IL-6 e TNF- α , estavam positivamente correlacionada com a pressão sanguínea em seres humanos. A associação de níveis elevados de TNF- α com hipertensão já foi demonstrada em modelos experimentais por abordagens farmacológicas ou genéticas, hipertensão induzida por Ang II, lúpus, síndrome metabólica e pré-eclâmpsia (Zinman et al 1999; Ito et al 2001; Guzik et al, 2007; Venegas-Pont et al 2010; Ramseyer e Garvin 2013).

Os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 também estão elevados em condições hipertensivas. Estudos demonstraram que a IL-6 é essencial para o desenvolvimento de hipertensão induzida por Ang II e que a ativação da via STAT3/JAK por IL-6 desempenha um papel-chave na doença (Brands et al 2010). Além disso, um estudo em humanos confirmou esses resultados mostrando aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 em resposta

à infusão aguda Angiotensina II, e que esses níveis também estão aumentados em pacientes hipertensos (Furuya et al 2010; Chamarthi et al 2011; De Miguel et al 2016).

Harrison e colaboradores (2011) sugeriram que estímulos hipertensivos, como a angiotensina II e alto teor de sal, provocam uma elevação modesta na pressão sanguínea, resultando no desenvolvimento de pré-hipertensão. O desenvolvimento de pré-hipertensão pode, por sua vez, conduzir à formação de neo-antígenos estimulando a ativação leucocitária. Leucócitos ativados, em seguida, entram nos vasos e no rim promovendo a entrada de outras células inflamatórias, impulsionando o processo inflamatório. Tais células inflamatórias liberam citocinas que causam vasoconstrição arteriolar e absorção de sódio e água resultando finalmente no desenvolvimento de hipertensão clínica.

Considerando o caráter multifatorial da Hipertensão Arterial Sistêmica e a fina regulação entre o sistema imune, a inflamação e a microbiota intestinal, avaliamos também a composição da microbiota intestinal para identificar outro biomarcador (além da inflamação) que pudesse distinguir indivíduos hipertensos de normotensos.

A microbiota intestinal é uma comunidade complexa, não só pela diversidade de espécies de microrganismos que habitam o intestino, como também pela forma como eles interagem entre si e o hospedeiro. Um delicado equilíbrio na composição da microbiota intestinal é fundamental para manter a imunidade intestinal e a homeostase corporal. Qualquer ruptura nesse equilíbrio pode gerar consequências fisiopatológicas devastadoras e tem sido correlacionada com muitas doenças, como doenças cardiovasculares sendo que a disbiose (estado alterado da ecologia microbiana) no trato gastrointestinal está associada com HAS (Lozupone et al.,2012; Howitt e Garret, 2012; Yang et al 2015; Qi et al 2015).

A microbiota intestinal é predominantemente formada pelos filos Firmicutes e Bacteroidetes e, em menor escala, por Actinobactérias e Proteobacteria que estão em

constante adaptação às modificações de estilo de vida, como a dieta consumida (Wu et al 2011; David et al 2014). Nossos resultados do grupo controle estão de acordo com esses achados. Observamos, na análise dos principais filos, um predomínio de Firmicutes (79,1%), Bacteroidetes (8,97%), Actinobacteria (3,61%) e Proteobacteria (5,42%) no grupo normotenso controle. No grupo de indivíduos com hipertensão, há uma menor abundância relativa na população de Bacteroidetes no grupo HAS, o que reflete no aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes, reconhecida como uma das características de disbiose da microbiota e associada a diversas condições patológicas como obesidade, diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Mariat et al 2009; Everard e Cani, 2013; Sanz e Moya-Pérez 2014; Yang et al 2015).

Neste estudo, usamos 4 parâmetros comumente utilizados para avaliar a diversidade alfa microbiana: Índice de diversidade de Shannon, diversidade filogenética (PD), Espécies observadas e Índice de diversidade microbiana de Chao1. Embora 3 desses parâmetros não tenham apresentado diferenças significativas entre os grupos, a diversidade alfa segundo Índice de diversidade de Shannon estava reduzida no grupo Hipertenso. Uma baixa diversidade alfa tem sido associada a doenças crônicas, incluindo doenças inflamatórias intestinais e obesidade (Manichanh et al 2012; Le Chatelier et al 2013; Blaser 2014; Garrett 2015; Huang e Bousheyl 2015; Hansen et al 2015).

A Análise de Coordenadas Principais das distâncias - PCOA – indicam que a composição da microbiota de Hipertensos e Normotensos foi agrupada em *clusters* distintos. A análise ponderada com base na abundância de sequências agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTU) indica, então, que o ambiente microbiano intestinal de Hipertensos e Normotensos era diferente entre os grupos. Uma observação interessante nessa análise foi o fato de que os grupos microbianos da família Lachnospiraceae, incluindo Roseburia, Coprococcus, significativamente conduziram o

padrão de agrupamento dos grupos, sendo assim, a hipertensão arterial sistêmica associada à disbiose, na população estudada, é caracterizado como uma redução de produtores de acetato e butirato.

Sabe-se que as comunidades microbianas anaeróbias do intestino grosso produzem os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) acetato, propionato e butirato, como seus principais produtos finais. O nomeado *cluster* microbiano Clostridium XIVa em geral e especialmente Roseburia spp e Coprococcus ssp são importantes bactérias produtoras de butirato (Neyrinck et al 2012; Qin et al 2012; Van den Abbeele et al 2013). Além disso, o gênero Roseburia tem sido associado com a promoção da saúde pela produção, não somente de butirato, mas também de ácido linoleico conjugado. Os ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) funcionam como uma fonte de energia para as células epiteliais do cólon, que derivam 60% -70% do seu fluxo de combustível dos SCFA. O butirato tem uma importância especial como uma fonte de energia para as células, uma vez que quase 65% desse ácido graxo é utilizado pela mucosa e mais de 70% do consumo de oxigênio em colonócitos isolados é devida à oxidação do butirato. O butirato também pode exercer vários efeitos anticancerígenos por meio da modulação do ciclo celular e da apoptose de colonócitos (Ardawi e Newsholme, 1985; Roediger, 1989; Carvalho e Saad 2013). Os SCFA são extremamente benéficos para o hospedeiro e parecem ter um efeito protetor contra diversas doenças. (Cummings et al 1987; Devillard et al 2007; Duncan et al 2007; Berni Canani et al., 2012; Carvalho e Saad 2013). Os SCFA também atuam como moléculas anti-inflamatórias. São capazes de inibir a ativação de NF-κB em células imunes por ligação a receptores ligados a proteína G 43 e 41 (GPR43 e GPR41), bloqueando assim as respostas inflamatórias e suprimindo a produção de TNF-α e IL-6. O butirato também reduz a IL-12 e aumenta expressão de IL-10 (Saemann et al 2000; Fukae et al 2005; Tedelind et al 2007; Al-Lahham et al 2010; Carvalho et al 2013). Este pode ser um dos mecanismos pelos quais

os indivíduos normotensos se mantêm não inflamados e apresentando um perfil microbiano associado à saúde intestinal e sistêmica.

Devemos esclarecer que, devido ao desenho transversal do estudo, não podemos fazer inferências de causa e efeito sobre as associações encontradas entre microbiota, inflamação e hipertensão arterial. Para esse tipo de conclusão, estudos longitudinais fazem-se necessários. Além disso, análises da microbiota intestinal ainda não são viáveis na prática clínica não sendo, portanto, uma forma prática e/ou barata para avaliarmos populações sob risco de fragilidade. Mas tal fato não tira a importância de avaliarmos as alterações de morbidades ou mesmo da idade em sistemas biológicos. Trabalhos como o nosso são capazes de demonstrar as finas alterações associadas a condições crônicas de risco que ocorrem em indivíduos considerados saudáveis mas com subclínico de evoluir para a fragilidade.

As alterações no perfil imunológico e na composição da microbiota intestinal não estavam relacionadas com a idade dos indivíduos analisados. Diversos estudos envolvendo a análise das atividades imunológicas em idosos mostram que células sanguíneas periféricas desses indivíduos são capazes de produzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em comparação com as células de indivíduos jovens. Por outro lado, a produção de citocinas reguladoras tais como IL-10 se encontra inalterada em indivíduos idosos (Di Bona et al, 2006; Solana et al, 2006; Sansoni et al, 2008). Esses dados parecem ser contraditórios, entretanto, vale lembrar que não houve diferenças quanto à idade ou ao gênero dos indivíduos nos grupos HAS e Controle, sugerindo que Hipertensos e Normotensos são encontrados em todas as faixas etárias acima de 25 anos e em homens e mulheres.

A ingestão de macronutrientes e fibras também foi avaliada em nosso estudo, pois é consenso que a dieta é capaz de modificar o perfil da microbiota intestinal (Perrim 2001; Reddy 2000; Zeng 2015). Entretanto, não observamos diferenças nesses parâmetros alimentares que justificassem as diferenças obtidas no perfil microbiano ou imunológico.

Vale ressaltar que todos os indivíduos do nosso estudo, mesmo aqueles diagnosticados com Hipertensão Arterial Sistêmica, apresentaram os critérios estabelecidos para classificação como “saudável”, destacando a autonomia (poder e controle sobre a tomada de decisões individuais) e independência (a capacidade de atingir algo sem ajuda externa) como critérios para sua classificação como tal. Isso sugere que indivíduos convivendo com a HAS (independentemente da idade) apresentam um perfil biológico de vulnerabilidade (imunológica e microbiana), embora isto não signifique que eles apresentem incapacidade funcional. Esses indivíduos hipertensos permanecem com a habilidade de cuidar de si mesmos e de suas vidas (Moraes et al 2016), principal objetivo das políticas pública de cuidado com o idoso.

Como anteriormente mencionado, o protocolo SENIEUR foi uma tentativa de se criar critérios muito restritos de avaliação dos indivíduos de idade avançada separando as alterações relacionadas ao envelhecimento daquelas ligadas a doenças e ao uso de medicamentos. Embora tenha sido uma ferramenta útil em termos científicos no sentido de prover dados sobre as modificações trazidas pelo processo do envelhecimento em si (Chakravarti and Abraham, 1999; Ginaldi et al., 1999; Ershler, 2001), esse tipo de critério se mostrou muito restritivo e pouco útil do ponto de vista prático do estabelecimento de medidas e políticas públicas de promoção da saúde do idoso. Tais políticas têm sofrido profundas consequências na organização de cuidados de saúde devido à maior incidência de doenças crônicas e incapacidades funcionais em idosos. No entanto, precisa-se destacar que algumas doenças de origem inflamatória e auto-imune podem ser mais

comuns entre as pessoas idosas, embora sua relação direta com o envelhecimento não seja clara. Além disso, tais morbidades não estão sempre ligadas à dependência funcional. Envelhecimento, por conseguinte, não é sinônimo de incapacidade e dependência, mas é relacionado a uma maior vulnerabilidade. Indivíduos diagnosticados com a mesma condição clínica podem exibir capacidades funcionais completamente diferentes (Veras 2012). A classificação mais completa e sofisticada do estado de saúde dos idosos proposta pelo grupo do Prof. Dr. Edgar Nunes de Moraes utilizando a capacidade funcional como o cerne da classificação de estado de saúde (Ramos 2003; Moraes 2012; 2016; Cesari et al 2014) foi a que escolhemos para este estudo. Essa escolha nos permitiu chegar a algumas conclusões importantes.

Em conjunto, os nossos resultados sugerem que há um padrão distinto de produção de citocinas por diferentes subconjuntos de leucócitos durante o envelhecimento e que esse perfil imune pode moldar e ser moldado por condições clínicas associadas.

Podemos supor também que o envelhecimento saudável nesta população brasileira reforça a hipótese do remodelamento que implica em mecanismos compensatórios de respostas imunes que mantêm um equilíbrio adequado entre as respostas reguladoras e pró-inflamatórias. O principal desses mecanismos seria a preservação da atividade imunológica inata capaz de compensar as falhas da imunidade adaptativa prejudicada na senescência. Acreditamos que o estudo dos parâmetros relacionados ao envelhecimento saudável em uma população tipicamente brasileira contribui para a identificação de biomarcadores característicos de faixas etárias distintas e de condições clínicas. Esses biomarcadores poderiam auxiliar na identificação daqueles indivíduos que se encontram no limite entre a saúde e a fragilidade.

Devido ao aumento progressivo da população idosa no Brasil, esses estudos são fundamentais para a concepção e implementação de intervenções mais racionais visando otimizar a função biológica em idade avançada, reduzir a incidência e gravidade de doenças crônicas e melhorar a qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

- Akbar AN, Fletcher JM. (2005). Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol.* 17(5):480-5.
- Alberti, S., Cevenini, E., Ostan, R., Capri, M., Salvioli, S., Bucci, L., Ginaldi, L., De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D. (2006). Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mechanisms of Ageing and Development.* (127) 560–566.
- Albright, J.W., Zuiga-Pflicker, J.C., Albright, J.F., (1995). Transcriptional control of IL-2 and IL-4 in T cells of young and old mice. *Cell Immunol.* 164, 170–175
- Al-Lahham SH, Peppelenbosch MP, Roelofsen H, Vonk RJ, Venema K. (2010). Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms. *Biochim Biophys Acta.*;1801(11):1175-83
- Andrade, SSA, Stopa, SR, Brito, AS, Chueri OS, Szwarcwald, CL e Malta DC. (2015) Prevalência de hipertensão arterial autorreferida na população brasileira: análise da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Epidemiol. Serv. Saúde* [online]. 2015, vol.24, (2):.297-304.
- Appay V, Sauce D. (2014). Naive T cells: the crux of cellular immune aging? *Exp Gerontol.* 54:90-3
- Ardawi M. S. M. e Newsholme E. A., (1985). “Fuel utilization in colonocytes of the rat,” *Biochemical Journal:* (231) 3: 713–719,
- Balu S, Thomas 3rd. J (2006). Incremental expenditure of treating hypertension in the United States. *Am J Hypertens.*;19(8):810-6
- Banchereau J., Briere F., Cauxetal C.. (2000).“Immunobiology of dendritic cells,” *Annual Review of Immunology*, vol. 18, pp. 767–811,.

Barros MBA, César CLG, Carandina L, Torre GD. (2006). Desigualdades sociais na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD-2003. *Cienc Saude Coletiva*. out-dez;11(4):911-26

Bautista, .E., Atwood, J.E., O'Malley, P.G., Taylor, A.J., (2004). Association between C-reactive protein and hypertension in healthy middle-aged men and women. *Coron. Artery Dis*. 15, 331–336.

Bautista, L.E., Vera, L.M., Arenas, I.A., Gamarra, G., (2005). Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF-alpha) and essential hypertension. *J. Hum. Hypertens*. 19, 149–154

Beard J, Officer A, Cassels A. *World report on ageing and health*. Geneva: World Health Organization, 2015. <http://www.who.int/ageing/publications/world-report-2015/en/>

Beard JR, Officer A, de Carvalho IA, Sadana R, Pot AM, Michel JP, Lloyd-Sherlock P, Epping-Jordan JE, Peeters GM, Mahanani WR, Thiyagarajan JA, Chatterji S. *The World report on ageing and health: a policy framework for healthy ageing*. *Lancet*. 2016 May 21;387(10033):2145-54.

Berczi I. and Nagy E. (1998). *Immune Modulating Agents*, Marcel Dekker, New York, NY, USA.

Berni Canani R, Di Costanzo M, Leone L (2012) The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice. *Clin Epigenetics*; 27;4(1):4.

Bhatia A, Sekhon HK, Kaur G. (2014). Sex hormones and immune dimorphism. *Scientific World Journal*. :159150.

Biagi E, Candela M., Franceschi C, Brigidi P. (2011). The aging gut microbiota: New perspectives. *Ageing Research Reviews* 10 428– 429

Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. (2010). Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One*, 5(5): e10667.

Blake, J. H., Rifai, N., Buring, J. E. and Ridker, P. M. (2003) Blood pressure, C-reactive protein, and risk of future cardiovascular events. *Circulation*108, 2993–2999

Blaser MJ (2014) The microbiome revolution. *J Clin Invest* 124: 4162–4165.

Bloom DE. 7 billion and counting. *Science* 2011; 333:562–69.

Brands MW, Banes-Berceli AKL, Inscho EW, Al-Azawi H, Allen AJ, Labazi H. (2010). Interleukin-6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and JAK2/STAT3 activation. *Hypertension*; 56:879–884.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. VIGITEL 2011: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2012

Bruunsgaard, H., Andersen-Ranberg, K., Hjelmberg, J.B., Pedersen, B.K., Jeune, B., (2003). Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am. J. Med.* 11, 278–283.

Campos C, Pera A, Lopez-Fernandez I, Alonso C, Tarazona R, Solana R. (2014). Proinflammatory status influences NK cells subsets in the elderly. *Immunol Lett.*; 162 (1 Pt B): 298-302.

Carvalho BM e Saad MJ. (2013). Influence of gut microbiota on subclinical inflammation and insulin resistance *Mediators Inflamm*;2013:986734

Carvalho JAM (1974). Regional trends in fertility and mortality in Brazil. *Popul Stud*; 28(3): 401-421.

Carvalho JAM, Garcia RA. (2003). O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. *Cad Saude Publica.*;19(3):725-733.

Cesari M, (2014). Gambassi G, Van Kan GA, Vellas B. The frailty phenotype and the frailty index: different instruments for different purposes. *Age and Ageing*; 43: 10-12.

Cevenini E, Bellavista E, Tieri P, Castellani G, Lescai F, Francesconi M, Mishto M, Santoro A, Valensin S, Salvioli S, Capri M, Zaikin A, Monti D, de Magalhães JP, Franceschi C. (2010). Systems biology and longevity: an emerging approach to identify innovative anti-aging targets and strategies. *Curr Pharm Des.*;16(7):802-13

Chae, C.U., Lee, R.T., Rifai, N., Ridker, P.M., (2001). Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 38, 399–403

Chakravarti B, Abraham GN (1999). Aging and T-cell-mediated immunity. *Mech Ageing Dev.*;108(3):183-206

Chamarthi B, Williams GH, Ricchiuti V, Srikumar N, Hopkins PN, Luther JM, Jeunemaitre X, Thomas A. (2011). Inflammation and hypertension: the interplay of interleukin-6, dietary sodium and the renin-angiotensin system in humans. *Am J Hypertension.*; 24:1143–1148.

Chen, J.H., Hales, C.N., Ozanne, S.E., (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* 35, 7417–7428

Chrestani MA, Santos Ida S, Matijasevich AM. (2009). Self-reported hypertension: validation in a representative cross-sectional survey. *Cad Saude Publica*; 25(11):2395-406.

Christensen K, Doblhammer G, Rau R, Vaupel JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet* 2009; 374:1196–208.

Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.*;8(1):18-30

Closs, VE; schwanke, CHA. A evolução do índice de envelhecimento no Brasil, nas suas regiões e unidades federativas no período de 1970 a 2010. *Rev. bras. geriatr. gerontol.* Sept. 2012; v. 15, n. 3, p. 443-458

Collins, D.P., Luebering, B.J., Shout, D.M., (1998). T-lymphocytes functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry. *Cytometry* 33 (2), 249–255.

Comin F, Speziali E, Correa-Oliveira R, Faria AM. (2008) Aging and immune response in chronic human schistosomiasis. *Acta Trop.*, 108(2-3):124-30.

Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. (1997). Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry*; 27:297/313.

Cummings J. H., Pomare E. W., Branch W. J., Naylor C. P. E., and Macfarlane G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood, *Gut*; (28) 10: 1221–1227.

Dalekos, G.N., Elisaf, M., Bairaktari, E., Tsolas, O., Siamopoulos, K.C., (1997). Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J. Lab. Clin. Med.* 129, 300–308.

Daulatzai MA. (2016). Fundamental role of pan-inflammation and oxidative-nitrosative pathways in neuropathogenesis of Alzheimer's disease in focal cerebral ischemic rats. *Am J Neurodegener Dis.*; 1;5(2):102-30

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*; 505:559–563.

Daynes, R.A., Araneo, B.A., Ershler, W.B., Maloney, C., Li, G.Z., Ryu, S.Y. (1993). Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *J. Immunol*, 150: 5219–5230.

De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L.(2005). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* Apr 11;579(10):2035-9.

De Miguel C, Rudemiller NP, Abais JM, Mattson DL (2015) Inflammation and hypertension: new understandings and potential therapeutic targets. *Curr Hypertens Rep.*;17(1):507

Devillard E, McIntosh FM, Duncan SH, Wallace RJ. (2007). Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *J. Bacteriol.*189: 2566-2570

Di Bona D, Cippitelli M, Fionda C, Cammà C, Licata A, Santoni A, Craxì A (2006). Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. *J Hepatol.*;45(2):271-9

Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, Hoogeveen R, Folsom AR, Heiss G; Atherosclerosis Risk in Communities Study. (2003) Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes* 52: 1799–1805

Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1073-1078.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 10;308(5728):1635-8

Eidinger D. and Garrett T. J., (1972). "Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation,"*The Journal of Experimental Medicine*, vol.136, no. 5, pp. 1098–1116,.

Ershler WB (2001). The value of the SENIEUR protocol: distinction between "ideal aging" and clinical reality. *Mech Ageing Dev.*;122(2):134-6.

Everard A, Cani PD. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.*;27:73–83

Faria AM, de Moraes SM, de Freitas LH, Speziali E, Soares TF, Figueiredo-Neves SP, Vitelli-Avelar DM, Martins MA, Barbosa KV, Soares EB, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Cardoso GM, Comin F, Teixeira R, Elói-Santos SM, Queiroz DM, Corrêa-Oliveira R, Bauer ME, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO (2008). Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *Neuroimmunomodulation.*; 15(4-6):365-79.

Faria, A.M. and Francheschi, C. (2013). Population Immunology: germs, aging and inflammation In: *Eco-Immunology. Evolutive aspects and future perspectives.*, Heidelberg, Germany : Springer; v.1, p. 145-162.

Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, Akkermans AD. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol.*; 68(1):219-26.

Fernandez-Real, J.M., Vayreda, M., Richart, C., Gutierrez, C., Broch, M., Vendrell, J., Ricart, W., (2001). Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1154–1159

Ferreira SR, Moura EC, Malta DC, Sarno, F. (2009). Frequência de hipertensão arterial e fatores associados: Brasil. *Rev. Saúde Pública*; 43(2): 98-106.

Fitch MD, Fleming SE. (1999). Metabolism of short-chain fatty acids by rat colonic mucosa in vivo. *Am J Physiol.*; 277(1 Pt 1):G31-40.

Franceschi C (2007) Inflammaging as a major characteristic of old people: can it be prevented or cured? *Nutr Rev* 65: S173–S176.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. (2000a) An evolutionary perspective in immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*, 908: 244-254.

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S. (2000c) Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity. *Parasitol Today*, 14(1): 23-26.

Franceschi C, Bonafe M. (2003) Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans*, 31: 457-461.

Franceschi C, Crepaldi G, Cristofalo VJ, Vijg J. (1992) Aging and cellular defense mechanisms. *Ann NY Acad Sci*, 663

Franceschi C, Mondello C, Bonafè M, Valensin S, Sansoni P, Sorbi S (1999). Long telomeres and well preserved proliferative vigor in cells from centenarians: a contribution to longevity? *Aging (Milano)*. 11(2):69-72

Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. (2000b) The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol*, 35: 879-896.

Franceschi C., Monti D., Barbieri D., Grassilli E., Troiano L., Salvioli S., Negro P., Capri M., Guido M., Azzi R., Sansoni P., Paganelli R, Fagiolo U., Baggio G, Donazzan S., Mariotti S., D'addato S., Gaddi A., Ortolani C., Cossarizza A.(1995). Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling. *Intern. Rev. Immunol.* 12, 57–74

Franceschi C1, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, Troiano L, Guido M, Bonafè M, Tropea F, Salomoni P, Benatti F, Bellesia E, Macchioni S, Anderlini R, Sansoni P, Mariotti S, Wratten ML, Tetta C, Cossarizza A. (1996). Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol Dial Transplant.*;11 Suppl 9:18-25

Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De Benedictis, G., Di Iorio, A., Caruso, C., Prolisso, G., Monti, D., (2005). Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 126 (2), 351–361.

Frias LAM, Carvalho JAM. Fecundidade nas regiões brasileiras a partir de 1903: Uma tentativa de reconstrução do passado através das gerações. In: Encontro Nacional de Estudos Populacionais; 1994; Belo Horizonte: Associação Brasileira de Estudos Populacionais;1994. p.23-46

Fried LP, Ferrucci L, Darer J, Williamson JD, Anderson G. (2004) Untangling the Concept of Disability, Frailty and Comorbidity: Implications for Improved Targeting and Care. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*; 59: 255-263.

Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke G, McBurnie MA (2001). Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 56: M146-156.

Fukae J; Amasaki Y, Yamashitaetal Y, (2005). Butyratesuppresses tumor necrosis factor α production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element, *Arthritis and Rheumatism*; (52) 9: 2697–2707

Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K, Tobe T, Clarke JM, Topping DL, Suzuki T, Taylor TD, Itoh K, Kikuchi J, Morita H, Hattori M, Ohno H. (2011). Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 27;469(7331):543-7.

Fulop T, Dupuis G, Baehl S, Le Page A, Bourgade K, Frost E, Witkowski JM, Pawelec G, Larbi A, Cunnane S. (2016). From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*; 17(1):147-57.

Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. (2004). Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 3: 217–226.

Fülöp T., Larbi A. e Pawelec G. (2013). Human T Cell Aging and the Impact of Persistent Viral Infections. *Front Immunol.*; 4: 271.

Furumoto, T., Saito, N., Dong, J., Mikami, T., Fujii, S., Kitabatake, A., (2002). Association of cardiovascular risk factors and endothelial dysfunction in japanese hypertensive patients: implications for early atherosclerosis. *Hypertens. Res.* 25, 475–480

Furuya Y, Satoh T, Kuwana M (2010). Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *Int J Rheum*, 2010.

Gardner EM, Murasko DM. (2002). Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology.*; 3(5):271-90.

Garrett WS (2015) Cancer and the microbiota. *Science* 348: 80–86.

Gazzinelli, G.; Katz, N.; Rocha, R.S. And Colley, D.G. (1983). Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. *J. Immunol.*, v.130, p.2891-2895.

Gerli, R., Monti, D., Bistoni, O., Mazzone, A.M., Peri, G., Cossarizza, A., Di Gioacchino, M., Cesarotti, M.E., Doni, A., Mantovani, A., Franceschi, C., Paganelli, R., (2000). Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech. Ageing Dev.* 20 (121(1–3)), 37–46.

Ginaldi L, De Martinis M, D'Ostilio A, Marini L, Loreto MF, Quagliano D. (1999). Immunological changes in the elderly. *Aging (Milano)*;11(5):281-6.

Gordilho A, Sérgio J, Silvestre J, Ramos LR, Freire MPA, Espíndola N, Maia R., Veras R., Karsch U. (2000). Desafios a serem enfrentados no terceiro milênio pelo setor saúde na atenção integral ao idoso. Rio de Janeiro: UnATI/UERJ.

Greene G.L, Sobel N.B., King W.J. and Jensen E.V. (1984). "Immunochemical studies of estrogen receptors," *The Journal of Steroid Biochemistry*, vol.20, no.1, pp.51–56.

Grossman, C. (1989) "Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis," *Journal of Steroid Biochemistry*, vol.34,no.1–6,pp.241–251.

Grubeck-Loebenstein B, Della Bella S, Iorio AM, Michel JP, Pawelec G, Solana R. (2009). Immunosenescence and vaccine failure in the elderly. *Aging Clin Exp Res*, 21(3):201-9

Guigoz Y, Dore´ J, Schiffrin J (2008) The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment. *Curr Op Clin Nutr Metab Care* 11:13–20

Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, Goronzy J, Weyand C, Harrison DG. (2007). Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med* 204: 2449 –2460,

Hansen TH, Gobel RJ, Hansen T, Pedersen O (2015) The gut microbiome in cardio-metabolic health. *Genome Med* 7: 33.

Harman, D., (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.

Harmsen HJ, de Goffau MC. (2016). The Human Gut Microbiota. *Adv Exp Med Biol.*;902:95-108.

Harrison DG¹, Guzik TJ, Lob HE, Madhur MS, Marvar PJ, Thabet SR, Vinh A, Weyand CM. (2011). Inflammation, immunity, and hypertension. *Hypertension.*;57:132–40

Herrero C, Marques L, Lloberas J, Celada A. (2001).IFN gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *J Clin Invest* 107: 485–493.

Hobbs, M.V., Weigle, W.O., Noonan, D.J., Torbett, B., McEvelly, E., Koch, R.J., Cardenas, G.J., Ernst, D.N., (1993). Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice. *J. Immunol.* 150, 3602–3614.

- Hodes, RJ (1995) Molecular alterations in the aging immune system. *J Exp Med* 182: 1–3
- Hollister EB, Gao C, Versalovic J. (2014) Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology*;146(6):1449-58.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.*; 22:283-307
- Howitt, M.R., Garrett, W.S..(2012) A complex microworld in the gut: gut microbiota and cardiovascular disease connectivity, *Nat. Med.* (18):1188–1189.
- Huang YJ, Boushey HA (2015) The microbiome in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 135: 25–30
- IBGE (2009). Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil.
- IBGE (2011). Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil
- Institute of Medicine. (2010). A population-based policy and systems change approach to prevent and control hypertension. Washington, DC: National Academies Press
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). (1998). Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,;
- Ito H, Ohshima A, Tsuzuki M, Ohto N, Takao K, Hijii C, Yanagawa M, Ogasawara M, Nishioka K. (2001). Association of serum tumour necrosis factor- α with serum low-density lipoprotein-cholesterol and blood pressure in apparently healthy Japanese women. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 188 –192,
- Jia, W., Li, H., Zhao, L. & Nicholson, J. K. (2008). Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nature Rev. Drug Discov.*7,123–129.
- Jose PA, Raj D. (2015). Gut microbiota in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.*;24(5):403-9
- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., Rieger, C., (1993). Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 26, 197–207.

Katz, N.; Chaves, A. And Pellegrino, J (1972). A simple device for quantitative stool thick smear technique in *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.14, p.397-400.

Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet.;365(9455):217-23.

Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, et al. (2008) Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. Physiology 23: 64–74.

Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa S, Tap J, Tims S, Zoetendal EG, Brunak S, Clément K, Doré J, Kleerebezem M, Kristiansen K, Renault P, Sicheritz-Ponten T, de Vos WM, Zucker JD, Raes J, Hansen T; MetaHIT consortium, Bork P, Wang J, Ehrlich SD, Pedersen O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. Nature. 29;500(7464):541-6.

Leser TD1, Mølbak L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. Environ Microbiol.;11(9):2194-206.

Ley RE1, Peterson DA, Gordon JI (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell.; 24;124(4):837-48

Ligthart GH (2001) The SENIEUR protocol after 16 years: the next step is to study the interaction of ageing and disease. Mech Ageing Dev, 122(2):136-40.

Ligthart GJ, Corberand JX, Fournier C, Galanaud P, Hijmans W, Kennes B, MullerHermelink HK, Steinmann GG: (1984). Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. Mech Ageing Dev; 28: 47–55.

Lima-Costa MF, Peixoto SV, Firmo JO. (2004). Validade da hipertensão arterial auto-referida e seus determinantes (projeto Bambuí). Rev Saúde Pública; 38(5): 637-42

Lloberas J, Celada A. (2002).Effect of aging on macrophage function. Exp Geront, 37:1325-1331.

Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*; 13;489(7415):220-30

Luckey TD (1972). Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr.*; 25(12):1292-4

Luiza-Silva M., Campi-Azevedo A.C., Batista M.A., Martins M.A., Avelar R.S., Da Silveira L.D., Bastos Camacho L.A., De Menezes M.R., De Lourdes De Sousa Maia M., Guedes Farias R.H., Da Silva F.M., Galler R., Homma A., Leite Ribeiro J.G., Campos Lemos J.A., Auxiliadora-Martins M., Eloi-Santos S.M., Teixeira-Carvalho A., Martins-Filho O.A. (2011). Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis.* v.204, p.873.

Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. (2001). Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr.*; 32 (1): 1-14.

Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. (2012). The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*; 9:599–608.

Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimaraes VD, Sokol H, et al. (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9: 123

Ministério da Saúde. DATASUS. Indicadores e Dados Básicos - Brasil, 2012. www.datasus.gov.br/idb.

Mor G., Sapi E., Abrahamsetal V.M. (2003). "Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes, "The Journal of Immunology, vol.170, no.1, pp.114–122, 2003

Moraes EN. Atenção à Saúde do Idoso: Aspectos Conceituais. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2012.

Moreira ML, Dorneles EM, Soares RP, Magalhães CP, Costa-Pereira C, Lage AP, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Araújo MS. (2015) Cross-reactivity of commercially available anti-human monoclonal antibodies with canine cytokines: establishment of a reliable panel to detect the functional profile of peripheral blood lymphocytes by intracytoplasmic staining. *Acta Vet Scand Sep* 11; 57:51.

Muller GC, Gottlieb MG, Luz Correa B, Gomes Filho I, Moresco RN, Bauer ME. (2015). The inverted CD4:CD8 ratio is associated with gender-related changes in oxidative stress during aging. *Cell Immunol*; 296(2):149-54.

Müller, L., Pawelec, G. (2014) Aging and immunity – Impact of behavioral intervention. *Brain Behav. Immun.* 39C:8-22.

Nasri F. O envelhecimento populacional no Brasil. *Einstein*. 2008;6 (Supl 1):S4-S6

Neish AS (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136: 65–80

Neyrinck AM, Van Hée VF, Piront N, De Backer F, Toussaint O, Cani PD, Delzenne NM. (2012). Wheat-derived arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic effect increase satietogenic gut peptides and reduce metabolic endotoxemia in diet-induced obese mice. *Nutr Diabetes*; 23;2:e28

Nikolich-Zugich, J., 2008. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 512–522.

Nogueira D, Faerstein E, Coeli CM, Chor D, Lopes CS, Werneck GL. (2010). Reconhecimento, tratamento e controle da hipertensão arterial: estudo Pró-Saúde, Brasil. *Rev Panam Salud Publica*; 27(2):103-9.

Nunes de Moraes E, Lanna F.M., Santos R.R., Bicalho M.A.C, Machado C.J., Romero D.E (2016). A NEW PROPOSAL FOR THE CLINICAL-FUNCTIONAL CATEGORIZATION OF THE ELDERLY: VISUAL SCALE OF FRAILITY (VS-FRAILITY). *J Aging Res Clin Practice*;5(1):24-30

Odamaki T, Kato K, Sugahara H, Hashikura N, Takahashi S, Xiao JZ, Abe F, Osawa R (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiol.*;16:90

Olsson J, Wikby A, Johansson B, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. (2000). Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev.* 20;121(1-3):187-201.

- Ottaviani E, Franceschi C. (1997). The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol Today.*;18(4):169-74.
- Paolisso G, Barbieri M, Bonafè M, Franceschi C. (2000). Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *Eur J Clin Invest.*;30(10):888-94.
- Passos VMA, Assis TD, Barreto SM. (2006). Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiol Serv Saude.*;15(1):35-45
- 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, (2002) update. *Front Biosci.* 7:d1056–d1183.
- Pawelec G, Goldeck D, Derhovanessian E. (2014). Inflammation, ageing and chronic disease. *Curr Opin Immunol.*; 29:23-8
- Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. (1998). Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol*, 64:703-712
- Pawelec G. (2006) Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol*, 41: 1239-1242
- Pawelec G1, Solana R. (2001). Immunoageing - the cause or effect of morbidity. *Trends Immunol.* Jul;22(7):348-9.
- Pawelec, G., (2012). Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun. Ageing* 9, 15
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meflah K, Menanteau J. (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut*;48:53–61
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. (2005). Bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 22,495–512.
- Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 3: 161–167.

Potestio M, Pawelec G, Di Lorenzo G, Candore G, D'Anna C, Gervasi F, Lio D, Tranchida G, Caruso C, Romano GC. (1999). Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes. *Exp Gerontol.*; 34(5):659-73.

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. (1999). Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*; 353 (9148): 196-200.

Prussin, C., (1997). Cytokine flow cytometry understanding cytokine biology at the single cell level. *J. Clin. Immunol.* 17, 195–203.

Prussin, C., Metcalfe, D.D., (1995). Detection of intracytoplasmatic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Meth.* 188, 117–128.

Qi Y, Aranda JM, Rodriguez V, Raizada MK, Pepine CJ. (2015) Impact of antibiotics on arterial blood pressure in a patient with resistant hypertension - A case report. *Int J Cardiol.*(15);201:157-8.

Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, Peng Y, Zhang D, Jie Z, Wu W, Qin Y, Xue W, Li J, Han L, Lu D, Wu P, Dai Y, Sun X, Li Z, Tang A, Zhong S, Li X, Chen W, Xu R, Wang M, Feng Q, Gong M, Yu J, Zhang Y, Zhang M, Hansen T, Sanchez G, Raes J, Falony G, Okuda S, Almeida M, LeChatelier E, Renault P, Pons N, Batto JM, Zhang Z, Chen H, Yang R, Zheng W, Li S, Yang H, Wang J, Ehrlich SD, Nielsen R, Pedersen O, Kristiansen K, Wang J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*: (4);490(7418):55-60

Rajilić-Stojanović M., Heilig H G H J, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H and De Vos W M. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol.* Jul 2009; 11(7): 1736–1751.

Ramos LR, Veras RP, Kalache A. Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. *Rev de Saude Publica.* 1987;21(3):211-224.

Ramos LR. (2003) Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso, São Paulo. *Cad. Saúde Pública*; 19: 793-798.

Ramseyer VD, Garvin JL. (2013). Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 15;304(10):F1231-42

Recasens M, López-Bermejo A, Ricart W, Vendrell J, Casamitjana R, Fernández-Real JM. (2005) An inflammation score is better associated with basal than stimulated surrogate indexes of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 112–116.

Reddy BS, Hirose Y, Cohen LA, Simi B, Cooma I, Rao CV. (2000). Preventive potential of wheat bran fractions against experimental colon carcinogenesis: implications for human colon cancer prevention. *Cancer Res*;60:4792–7.

Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S: Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002, 169:4697-4701.

Ribeiro AB, Plavnik FL. (2007). *Atualização em Hipertensão Arterial – Clínica, Diagnóstica e Terapêutica*. São Paulo: Atheneu.

Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. (2016). Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation*. Jan 26;133(4):422-33

Ridker, P. M., Buring, J. E., Shih, J., Matias, M. and Hennekens, C. H. (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events in apparently healthy women. *Circulation*, 731–733

Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I, Mitnitski A. (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ*; 173: 489-495

Roediger W. E. (1989), Short chain fatty acids as metabolic regulators of ion absorption in the colon. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*; (86) 116–125.

Rostaing, L., Tkaczuk, J., Durand, M., Peres, C., Durand, D., de Preval, C., Ohayon, E., Abbal, M., (1999). Kinetics of intracitoplasmatic Th1 and Th2 cytokine production assessed

by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 35, 318–328.

Säemann MD, Böhmig GA, Osterreicher CH, Burtscher H, Parolini O, Diakos C, Stöckl J, Hörl WH, Zlabinger GJ. (2000). Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *FASEB J.* 14(15):2380-2.

Salam N., Rane S., Das R., Faulkner M., Gund R., Kandpal U., Lewis V., Mattoo, Savit H., Prabhu, Ranganathan V., Durdik J., George A., Rath S. e Bal V. (2013) T cell ageing: Effects of age on development, survival & function. *Indian J Med Res.* Nov; 138(5): 595–608.

Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E, Fagiolo U., Passeri M., Franceschi C. (1993). Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood.*; 80: 2767-2773.

Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Zanlari L, Telera A, Lucchini G, Passeri G, Monti D, Franceschi C, Passeri M (2008). The immune system in extreme longevity. *Exp Gerontol*;43(2):61-5.

Sanz Y, Moya-Pérez A. (2014). Microbiota, inflammation and obesity. *Adv Exp Med Biol.*;817:291–317.

Sarkar D, Fisher PB. (2006). Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett.*; 8;236(1):13-23.

Shearer, G.M., (1997). Th1/Th2 changes in aging. *Mech. Ageing Dev.* 94, 1–5

Silveira AC, Santana MA, Ribeiro IG, Chaves DG, Martins-Filho OA. (2015) The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors. *BMC Hematol* Jan 16; 15(1): 1.

Singh T, Newman AB (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. *Ageing Res Rev.*;10(3):319-29.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. V diretrizes brasileiras de hipertensão arterial. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89 (3)

Solana R, Alonso MC, Pena J. (1999) Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol*.34: 435-443

Solana R, Graham Pawelec and Raquel Tarazona. (2006) Aging and Innate Immunity.. *Immunity*. (24) 491–494.

Solana R, Mariani E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*.18: 1613-1620.

Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol*. 2012 Oct; 24 (5): 331-41.

Speziali, E., Bethony, J., Martins-Filho, O., Fraga, L. A. O., Lemos, D. S., Souza, L. J., Correa-Oliveira, R., and Faria, A. M. C. (2004) Production of interferon- γ natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation*. 13(5/6), 327-333

Stecher B, Denzler R, Maier L, Bernet F, Sanders MJ, Pickard DJ, Barthel M, Westendorf AM, Krogfelt KA, Walker AW, Ackermann M, Dobrindt U, Thomson NR, Hardt WD. (2012). Gut inflammation can boost horizontal gene transfer between pathogenic and commensal Enterobacteriaceae. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 109, 1269–1274

Stecher B, Maier L, Hardt WD. (2013). 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol.*;11(4):277-84.

Stuveling, E.M., Bakker, S.J., Hillege, H.L., Burgerhof, J.G., de Jong, P.E., Gans, R.O., de Zeeuw, D., PREVEND Study Group., 2004. C-reactive protein modifies the relationship between blood pressure and microalbuminuria. *Hypertension*. 43, 791–796.

Sung, K.C., Suh, J.Y., Kim, B.S., Kang, J.H., Kim, H., Lee, M.H., Park, J.R., Kim, S.W. (2003). High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension. *Am. J. Hypertens*. 16, 429–433

Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A (2007) Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.*;13(20):2826-32.

Testa, R., Olivieri, F., Bonfigli, A.R., Sirolla, C., Boemi, M., Marchegiani, F., Marra, M., Cenerelli, S., Antonicelli, R., Dolci, A., Paolisso, G., Franceschi, C.. Interleukin-6-174G>C polymorphism affects the association between IL-6 plasma levels and insulin resistance in Type 2 diabetic patients. (2006). *Diabetes Res. Clin. Pract.* *Diabetes Res Clin Pract.* 71(3):299-305.

Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. (2010). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev.*;9(2):107-16.

Topping DL1, Clifton PM (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.*; 81(3):1031-64.

Tulic MK, Hodder M, Forsberg A, McCarthy S, Richman T, D'Vaz N, van den Biggelaar AH, Thornton CA, Prescott SL. (2011). Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. *J Allergy Clin Immunol*; 127(2): 470-478.

UNDESA. World economic and social survey 2007: development in an ageing world. New York, NY: UN Department of Economic and Social Affairs, 2007.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84

Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, Thas O, De Weirtdt R, Kerckhof FM, Van de Wiele T (2013). Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.*;7(5):949-61.

Vargas CM, Burt VL, Gillum RF, Pamuk ER. (1997). Validity of self-reported hypertension in the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1991. *Prev Med*; 26:678-85.

Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C.(2007) Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.*;128:83–91

Venegas-Pont M, Manigrasso MB, Grifoni SC, LaMarca BB, Maric C, Racusen LC, Glover PH, Jones AV, Drummond HA, Ryan MJ. Tumor necrosis factor-alpha antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension* 56: 643–649, 2010.

Ventura M, O'Flaherty S, Claesson MJ, Turrone F, Klaenhammer TR, van Sinderen D, O'Toole PW. (2009). Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nature Rev. Microbiol.*7,61–71

Veras RP. (2012) Gerenciamento de doença crônica: equívoco para o grupo etário dos idosos. *Rev Saúde Pública* 2012; 46: 929-34.

Verhasselt V. (2010). Neonatal tolerance under breastfeeding influence. *Curr Opin Immunol.*;22(5):623-30.

Villanueva JL, Solana R, Alonso MC, Pena J. (1990). Changes in the expression of HLA-class II antigens on peripheral blood monocytes from aged humans. *Dis Markers* 8: 85–91.

WHO (2011). *Global Health and Aging*. NIH Publication no. 11-7737.

Wong, L.L.R. e Carvalho, J.A. (2006) O rápido processo de envelhecimento populacional do Brasil: sérios desafios para as políticas públicas. *Rev. Bras. Est. Pop.*, 23 (1): 5-26.

Woodsmansley EJ (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 102:1178–1186

World Health Organization. *The World Health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life*. Geneva; 2002

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, Bewtra M, Knights D, Walters WA, Knight R, Sinha R, Gilroy E, Gupta K, Baldassano R, Nessel L, Li H, Bushman FD, Lewis JD. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*; 334:105–108

Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG. (1997). TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy*; 27 (11): 1261-9.

Yamaguchi T., Watanuki H., and Sakai M. (2001) "Effects of estradiol, progesterone and testosterone on the function of carp, *Cyprinus carpio*, phagocytes *in vitro*: "Comparative Biochemistry and Physiology, vol.129, no.1, pp.49–55,.

Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M. (2015). Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*; 65(6):1331-40.

Yang T, Santisteban MM, Rodriguez V, Li E, Ahmari N, Carvajal JM, Zadeh M, Gong M, Qi Y, Zubcevic J, Sahay B, Pepine CJ, Raizada MK, Mohamadzadeh M.(2015). Gut dysbiosis is linked to hypertension *Hypertension*.;65(6):1331-40.

Yatsunencko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*. 9;486(7402):222-7

Youn, J.-C., Yu, H. T., Lim, B. J., Koh, M. J., Lee, J., Chang, D.-Y., Choi, Y. S., Lee, S.-H., Kang, S.-M., Jang, Y. et al. (2013) Immunosenescent CD8 + T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension. *Hypertension* 62, 126–133

Yu, B.P., Yang, R., (1996). Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 786, 1–11.

Yu, X., Yang, Z., Yu, M., (2010). Correlation of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 with hypertensive renal damage. *Ren. Fail.* 32, 475–479

Zanni, F., Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F., Zanlari, L., Telera, A., Di Pede, P., Passeri, G., Pedrazzoni, M., Passeri, M., Franceschi, C., Sansoni, P., (2003). Marked increase with age of Type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8+ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp. Gerontol.* 38, 981–987.

Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, Stevens MJ, Szeffler SJ, Accurso FJ, Sagel SD, Harris JK. (2015). Assessment of airway microbiota and inflammation in cystic fibrosis using multiple sampling methods. *Ann Am Thorac Soc.*;12(2):221-9.

Zeng H, Claycombe KJ, Reindl KM. (2015). Butyrate and deoxycholic acid play common and distinct roles in HCT116 human colon cell proliferation. *J Nutr Biochem.*;26(10):1022-8

Zhao, S., Li, Q., Liu, L., Xu, Z., Xiao, J., (2004). Simvastatin reduces interleukin-1beta secretion by peripheral blood mononuclear cells in patients with essential hypertension. *Clin. Chim. Acta* 344, 195—200

Zinman B, Hanley AJ, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. (1999). Circulating tumor necrosis factor-alpha concentrations in a native Canadian population with high rates of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 272–278



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0728.0.203.203-11

Interessado(a): Profa. Ana Maria Caetano de Faria
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de março de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo de fatores imunológicos, genéticos e da microbiota associada ao "envelhecimento saudável" em populações italianas. Fases I e II**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Processo No 728/11

Projeto: "Estudo dos fatores imunológicos, genéticos e da microbiota associados ao envelhecimento saudável em populações brasileiras e italianas. Fases I e II"

Data de recebimento no COEP: 23/12/2011

Data de recebimento pelo parecerista: 07/03/2012

Área do conhecimento: Ciências Biológicas – Imunologia

Pesquisador (a) responsável: Ana Maria Caetano de Faria

Instituição responsável: Instituto de Ciências Biológicas (ICB) – UFMG

Instituição onde será realizado o estudo Departamento de Bioquímica e Imunologia— ICB - UFMG

Documentação:

Folha de rosto CONEP devidamente datado e assinado

Protocolo COEP devidamente datado e assinado

Declaração de apoio institucional

Termo de compromisso

TCLE

Parecer da Câmara Departamental

Currículo do pesquisador

Orçamento financeiro definindo a fonte dos recursos

Resumo do projeto: Trata-se de projeto piloto cujo objetivo é iniciar o estudo comparativo dos fatores imunológicos relacionados ao envelhecimento saudável em população de brasileiros e italianos. Serão recrutados, em Minas Gerais, 80 indivíduos saudáveis da área urbana de Governador Valadares com idade acima de 25 anos. Serão examinados parâmetros imunológicos, polimorfismos genéticos e a microbiota desses sujeitos por meio de coleta de sangue periférico e de amostras de urina e fezes. Esses dados serão comparados com aqueles já obtidos na Universidade de Bologna na Itália por meio de colaboração já estabelecida entre os pesquisadores envolvidos.

Aspectos éticos: São respeitados os princípios éticos do sigilo das informações coletadas e não há riscos significativos aos participantes do projeto, uma vez que serão adotados todos os critérios de segurança necessários à coleta de amostras de sangue periférico conforme devidamente explicitados pelos pesquisadores. O termo de consentimento livre e esclarecido é objetivo, a linguagem é adequada a um adulto, descreve adequadamente os procedimentos e esclarece as garantias dos sujeitos.

Mérito e voto: O projeto está bem delineado e atende aos objetivos propostos pelo pesquisador. O estudo não oferece riscos significativos e proporcionará maior conhecimento dos fatores imunológicos, genéticos e da microbiota associados ao envelhecimento saudável em populações brasileiras e italianas. O termo de consentimento livre e esclarecido é adequado. Diante do exposto, SMJ, voto pela **aprovação** do projeto.

19/03/2012

ANEXO 2

ESTUDO DO ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL EM POPULAÇÕES BRASILEIRA E ITALIANA QUESTIONÁRIO PADRONIZADO MODIFICADO A PARTIR DO PADRÃO GEHA - (Consortium Europeu Genetics of Health Aging Individual)

IDENTIFICAÇÃO DO ENTREVISTADOR	
Código Individual (identificação do entrevistador): Aloisio Proba (2) Jarbas Souza	1. CI: __ __
Data da entrevista: ____/____/____	2. DATA ____/____/____
Por favor, responda o máximo de questões possíveis marcando nos quadrados disponíveis. Se você não tem certeza o que responder a uma determinada pergunta, não se preocupe, apenas deixa-a em branco. O coordenador da pesquisa irá auxiliá-lo com as questões deixadas em aberto. Por favor, preencha o questionário em letras maiúsculas.	
CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	
Identificação do participante Nome (completo/ sem abreviações): _____	3. ID: ____
Sexo: (0) Masculino (1) Feminino	4. SEXO: ____
Data de nascimento: Dia: ----- Mês: ----- Ano: -----	5. DATANASC: ____/____/____
6. Local de nascimento: Município/Estado/Pais -----	6. MUNESP: ____
Governador Valadares-MG-Brasil Municípios em torno de Governador Valadares – MG (micro/macro) Outros municípios do Estado de Minas Gerais Municípios de outros Estados Outro País	
CARACTERÍSTICAS SOBRE ESTADO PREGRESSO E ATUAL DE SAÚDE	
(ESTADO DE SAÚDE ATUAL)	
7. Quais dos seguintes problemas de saúde/doenças você tem	
7a. Doenças Neurológicas (ex: Parkinson, AVE, exceto doenças relacionadas à perda importante de memória) : (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7a.DNEURO: _____ 7a1 DNEUROID: _____
7b. Doenças cardíacas:	
7b1. Angina: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7b1. ANGINA: _____ 7b1.1ANGINAID: _____
7b2.Batimentos cardíacos irregulares: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7b2. BATIRREG: _____ 7B2.2 BATREGID: _____
7b3.Insuficiência cardíaca (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7b3. ICC 7B3.3 ICCID: _____
7c. Pressão alta (hipertensão tratada com medicamentos): (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7c. HAS: _____ 7c1: HASID: _____
7d. Doenças respiratórias crônicas (DPOC/asma): (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7d. DPOC: _____ 7d1. DPOCID: _____
7e. Insuficiência renal Crônica: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7e. IRC: _____ 7e1. IRCID: _____
7f. Colesterol alto: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7f. COLESALT: _____ 7f1. COLALTID: _____
7g. Diabetes: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7g. DIABETES: _____ 7g1. DIABETID: _____
7h. Hipertireoidismo: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7h. HIPER: _____ 7h1. HIPERID: _____
7i. Hipotireoidismo: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7i. HIPOT: _____ 7i1. HIPOTID: _____
7j. Doença autoimune (Lupus, esclerose múltipla, etc): (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7j. DAUTO: _____ 7j1. DAUTOID: _____

7k. Cirrose Hepática: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7k. CIRROSE: _____ 7k1. CIRROID: _____
7l. Osteoporose: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7l. OSTEOP: _____ 7l1. OSTEID: _____
7m. Artrite (incluindo artrite óssea ou reumatismo) (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7m. ARTRITE: _____ 7m1. ARTRID: _____
7m2. Dor nas costas (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7m2. DCOSTA: _____ 7m2.1 DCOSTAID: _____
7m3. Dor em diferentes locais – no momento Por mais de 3 meses (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7m3. DMOMENTO: _____ 7m3.1 DMOMID: _____
7n. Problemas sérios de memória (p.ex. demência) (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7n. PMEMORIA: _____ 7n1. PMEMORID: _____
7o. Outros problemas mentais: (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade de início: _____	7o. PMENTAIS: _____ 7o 1. PMENTAID: _____
8. Já se submeteu a qualquer um dos seguintes procedimentos cirúrgicos (ponte safena, angioplastica coronariana, cirurgia de artérias, colocação de marca passo). (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade da cirurgia: _____	8. CIRURGIA: _____ 8a1. CIRURGID: _____
ESTADO DE SAÚDE PREGRESSO	
9- Você já teve alguma das seguintes doenças?	
9a. Pneumonia (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade da 1º vez: _____	9a. PNEUMO: _____ 9a1. PNEUMOID: _____
9b. Infarto do miocárdio (angina, dor no peito) (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade da 1º vez: _____	9b. IMIOCARD: _____ 9b1. MIOCARID: _____
9c. Derrame cerebral (hemorragia, isquemia) (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade da 1º vez: _____	9c. AVE: _____ 9c1. AVEID: _____
9d. Tumor maligno (câncer): (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. Se sim, Idade da 1º vez: _____	9d. CANCER: _____ 9d1. CANCERID: _____
9e. Para as mulheres: diabetes durante a gravidez: (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (ex. homem) (9) Não sabe. Se sim, Idade da 1º vez: _____	9e. DIABETE: _____ 9e1. DIABETID: _____
10. O seu peso mudou nos últimos 12 meses? (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (RESPOSTA “Não” ou “não sabe” pular para questão 11)	10. PESO: _____
10a. Ganho Kg: _____	10a. GANHO: _____
10b. Perda Kg: _____	10b. PERDA: _____
11 – Tratamentos e medicamentos	
11a. – Você usa algum medicamento regularmente? (RESPOSTA “Não” ou “não sabe” pular para questão 12) (0) Não (1) Sim (9) Não sabe	11a MREGULAR: _____
Se sim, preencha o esquema abaixo: (a ser preenchido pelo entrevistador)	
Nome do medicamento	Para qual
doença	Código ATC
1. ANTIDEPRESSIVO (EX. inserir nomes)	11a ANTIDEPR
2. Antihipertensivo (EX: PA)	11b. ANTIHAS
3. osteoporose EX: Osteoporose	11c. OSTEOP
4. ansiolítico EX:	11d. ANSIO
5. Antieméticos EX: Náusea, Vômitos	11e ANTIEME
6. Diuréticos	11f DIURE
7. Antiarrítmicos EX: Arritmia Cardíaca	11g ANTIARIT
12 – Durante a última semana, você tomou algum antibiótico, corticóide ou anti-inflamatório? (0) Não (1) Sim (9) Não sabe	
Se sim, especifique qual: _____	
13 – Para as mulheres apenas: Durante o último ano, você usou algum medicamento anticoncepcional ou de reposição hormonal? (RESPOSTA “Não” ou “não sabe” pular para questão 14) (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (ex. homem) (9) Não sabe	
Se sim, especifique qual: _____	

14 - Sua família		
14a. – Seu pai biológico: Ano do nascimento: ----- (9999) não soube responder		14a. PAINASC: _____
14b. Vivo: Sim ---- (1) Não ---- (0) (9) Não sabe/não respondeu Se falecido, ano do falecimento: ----- (9999) não soube responder		14b. VIVO: _____ 14b1. ANOFALEC: _____
14c. Causa da morte: (8) não se aplica (9) não sabe/não respondeu		
14c1. Doença cardíaca: Sim ---- (1) Não ---- (0)		14c1. DCARDI: _____
14c2. Câncer (incluindo leucemias e linfomas): Sim ---- (1) Não ---- (0)		14c2. CANCER: _____
14c3. Acidente: Sim ---- (1) Não ---- (0)		14c3. ACIDENT: _____
14c4 .Outra causa: Sim ---- (1) Não ---- (0)		14c4. OCAUSA: _____
15 - Sua mãe biológica: Ano do nascimento: ----- (9999) não soube responder		15. MAENASC: _____
15a. Vivo: Sim ---- (1) Não ---- (0) (9) Não sabe/não respondeu Se falecido, ano do falecimento: ----- (9999) não soube responder		15a. VIVA: _____ 15ª1. ANOFALEC: _____
15b. Causa da morte: (8) não se aplica (9) não sabe/não respondeu		
15b1. Doença cardíaca Sim ---- (1) Não ---- (0)		15c1. DCARDI: _____
15b2. Câncer (incluindo leucemias e linfomas) Sim ---- (1) Não ---- (0)		15c2. CANCER: _____
15b3. Acidente Sim ---- (1) Não ---- (0)		15c3. ACIDENT: _____
15b4. Outra causa Sim ---- (1) Não ---- (0)		15c4. OCAUSA: _____
16 - Seus irmãos e irmãs		
16a – Quantos irmãos e irmãs você tem ou teve (excluindo você, meio-irmãos e meio-irmãs)?		
16a1. Número de irmãos: _____		16a1. NIRMAOS: _____
16b1. Número de irmãs -----		16b1. NIRMAS: _____
17 – Seus filhos e filhas (biológicos)		
17a. – Quantos filhos/filhas você tem? -----		17a. FILHOS: _____
17b. -Quantos estão vivos(as)? -----		17b. VIVOS: _____
18 - Qual é o seu estado civil?		
18a. Nunca foi casado(a)		18a. NCASADO: _____
18b. Casado(a) Indique a idade do seu/sua esposo(a) Idade: -----		18b. CASADO: _____ 18b1. IDESPOSO: _____
18c. Divorciado(a), separado(a)		18c. DIVORCIO: _____
18d. Viúvo/viúva: indique com que idade seu/sua esposo(a) faleceu Idade: -----		18d. VIUVO: _____ 18d1. IDFALEC: _____
18e. Se viúvo/viúva, quando sua esposa/esposo faleceu?		18e. ANOFALEC: _____
19 – Sua educação		
Para ser preenchido pelo entrevistador: Entrevistado:		
19a. Nunca foi a escola (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (9) não sabe/não respondeu		19a ENTREV: _____
19b. Não terminou o ensino fundamental inicial (até a 4ª série) (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (9) não sabe/não respondeu		19b ENTREV: _____
19c. Terminou o ensino fundamental inicial (0) Não (1) Sim		19c ENTREV: _____
19d. Não terminou o ensino fundamental (até a 9ª série) (0) Não (1) Sim		19d ENTREV: _____
19e. Terminou o ensino fundamental (até a 9ª série) (0) Não (1) Sim		19e ENTREV: _____
19f. Não terminou o ensino médio (2º grau científico ou técnico) (0) Não (1) Sim		19f ENTREV: _____
19g. Terminou o ensino médio (2º grau científico ou técnico) (0) Não (1) Sim		19g ENTREV: _____
19h. Não terminou o ensino superior (3º grau) (0) Não (1) Sim		19h ENTREV: _____
19i. Terminou o ensino superior (3º grau) (0) Não (1) Sim		19i ENTREV: _____
19j. Não terminou o mestrado (stritu ou lato sensu) (0) Não (1) Sim		19j ENTREV: _____

19k. Terminou o mestrado (0) Não (1) Sim	19k ENTREV: _____
19l. Não terminou o doutorado (0) Não (1) Sim	19l ENTREV: _____
19m. Terminou o doutorado (0) Não (1) Sim	19m ENTREV: _____
19n. Não sabe (0) Não (1) Sim	19n ENTREV: _____
19.1 Grau de escolaridade Esposo/a	
19a1. Nunca foi a escola (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (9) não sabe/não respondeu	19a1. Esposo/a _____
19b1. Não terminou o ensino fundamental inicial (até a 4ª série) (0) Não (1) Sim (8) Não se aplica (9) não sabe/não respondeu	19b1. Esposo/a _____
19c1. Terminou o ensino fundamental inicial (0) Não (1) Sim	19c1. Esposo/a _____
19d1. Não terminou o ensino fundamental (até a 9ª série) (0) Não (1) Sim	19d1. Esposo/a _____
19e1. Terminou o ensino fundamental (até a 9ª série) (0) Não (1) Sim	19e1. Esposo/a _____
19f1. Não terminou o ensino médio (2º grau científico ou técnico) (0) Não (1) Sim	19f1. Esposo/a _____
19g1. Terminou o ensino médio (2º grau científico ou técnico) (0) Não (1) Sim	19g1. Esposo/a _____
19h1. Não terminou o ensino superior (3º grau) (0) Não (1) Sim	19h1. Esposo/a _____
19i1. Terminou o ensino superior (3º grau) (0) Não (1) Sim	19i1. Esposo/a _____
19j1. Não terminou o mestrado (stritu ou lato sensu) (0) Não (1) Sim	19j1. Esposo/a _____
19k1. Terminou o mestrado (0) Não (1) Sim	19k1. Esposo/a _____
19l1. Não terminou o doutorado (0) Não (1) Sim	19l1. Esposo/a _____
19m1. Terminou o doutorado (0) Não (1) Sim	19m1. Esposo/a _____
19n1. Não sabe (0) Não (1) Sim	19n1. Esposo/a _____
20 – Sua ocupação	
20a.- Você tem ou já teve uma ocupação? (0) Não (1) Sim	20a. OCUPACAO: _____
Se a resposta for sim, qual foi a ocupação mais duradoura durante a sua vida?	20a1. QUAL: _____
(1) Legisladores, gerentes (2) Profissionais liberais (3) Professores universitários (4) Professores ensino médio e elementar (5) Técnicos especializados (6) Escriturários e contadores (7) Trabalhadores do comércio (8) Agricultores e pescadores (9) Artesãos (marceneiros, serralheiros, etc) (10) Fornecedores de serviços (bombeiros, eletricitas, garçons, cozinheiros, auxiliares de cozinha, etc) (11) Operários (12) Empregados domésticos (faxineiros, cozinheiros, etc) (13) Militares (14) Não aplicável	

21b.-Sua/seu esposa/o tem ou já teve uma ocupação? (0) Não (1) Sim	21b. OCUPESP: _____
Se a resposta for sim, qual foi a ocupação mais duradoura durante a sua vida? _____	21b1. QUAL: _____
(1) Legisladores, gerentes (2) Profissionais liberais (3) Professores universitários (4) Professores ensino médio e elementar (5) Técnicos especializados (6) Escriturários e contadores (7) Trabalhadores do comércio (8) Agricultores e pescadores (9) Artesãos (marceneiros, serralheiros, etc) (10) Fornecedores de serviços (bombeiros, eletricitas, garçons, cozinheiros, auxiliares de cozinha, etc) (11) Operários (12) Empregados domésticos (faxineiros, cozinheiros, etc) (13) Militares (14) Não aplicável	
22 – Qual é a renda familiar (pode ser um valor aproximado) ? (verificar se no valor está incluso ou não receitas oriundas de bolsas governamentais)	22. RENDA: _____
22a1 - Recebe algum tipo de bolsa ou ajuda governamental ? (RESPOSTA “Não” ou “não sabe” pular para questão 23) Sim ----- 1 Não ----- 0 (9) Não sabe/não respondeu	22a1. BOLSA: _____
22b Se sim, qual o tipo? _____ (1) Bolsa Família (2) Bolsa Escola (3) PROUNI (4) Auxilio Pescador (5) Outro (8) Não se aplica	22b. QUAL: _____
22c. Qual o valor desse auxilio? _____	22c. VALOR: _____
22d. Desde quando você o recebe? _____	22d. TEMPO: _____
23 – Sua casa - Em qual o tipo de habitação você vive?	23. HABITACAO: _____
(1) Casa (Urbana ou Rural) (2) Apartamento (3) Residência especializada para idosos (4) Residência especializada com cuidados médicos para idosos (5) Outro tipo	
Se você vive em uma residência especializada para idosos (com ou sem cuidados médicos): (RESPOSTA diferente de casa especializada pular para questão 23b)	
23a. Por quanto tempo você vive em residência especializada para idosos? _____	23a TEMPO: _____
23b. – Quantas pessoas vivem na mesma habitação com você (excluindo você mesmo)? _____	23b. HABITAVC: _____
23c. Vive Sozinho (a) (RESPOSTA “Sim” pular para questão 24) (0) Não (1) Sim Se Vive Sozinho(a), por quanto tempo? _____	23c. VIVESO: _____ 23c1. TEMPO: _____
23d. - Você vive em companhia das seguintes pessoas? (podem ser marcadas varias opções)	
23d1. Esposo/a ou parceiro/a (0) Não (1) Sim	23d1. ESPOSO/A: _____
23d2. Irmão(s)/irmã(s) (0) Não (1) Sim	23d2. IRMAO/A: _____
23d3. Filho(s)/filha(s) (0) Não (1) Sim	23d3. FILHO/A: _____
23d4. Outro(s) parente(s) (0) Não (1) Sim	23d4. PARENTE: _____

23d5. Amigo(a)/amigos(as) (0) Não (1) Sim	23d5. AMIGO/A: _____
23d6. Outro (0) Não (1) Sim	23d6. OUTRO: _____
24 – Sua rede social	
Indique até 5 pessoas que são as mais importantes no sentido de fornecerem assistência quando você necessita. Por favor, mencione-as pelo tipo de relacionamento (parente, amigo, etc).	
24.1 pessoa 1	
24.1.1 Tipo de relação (01) Parente (02) Amigo (03) vizinho (04) Outros (ex. Prof. de saúde)	24.1.1 TIPO1: _____
24.1.2 Frequência de contato (01). Todos os dias (02). De 2-3 dias na semana (03). Algumas vezes na semana (04). Uma vez no mês (05) Apenas se requisitado	24.1.2 CONTATO1 : _____
24.1.3 Nível de ajuda (01). Sempre disponível (02). Moderadamente (03).Raramente	24.1.3 AJUDA1: _____
24.1.4 Distância (01). Mesma casa (02). No raio de 1km (03) Na cidade (04). Outra cidade	24.1.4 DISTANCIA1: _____
24.2 pessoa 2	
24.2.1 Tipo de relação (01) Parente (02) Amigo (03) vizinho (04) Outros (ex. Prof. de saúde)	24.2.1 TIPO2: _____
24.2.2 Frequência de contato (01). Todos os dias (02). De 2-3 dias na semana (03). Algumas vezes na semana (04). Uma vez no mês (05) Apenas se requisitado	24.2.2 CONTATO2: _____
24.2.3 Nível de ajuda (01). Sempre disponível (02). Moderadamente (03).Raramente	24.2.3 AJUDA2: _____
24.2.4 Distância (01). Mesma casa (02). No raio de 1km (03) Na cidade (04). Outra cidade	24.2.4 DISTANCA2: _____
24.3 Pessoa 3	
24.3.1 Tipo de relação (01) Parente (02) Amigo (03) vizinho (04) Outros (ex. Prof. de saúde)	24.3.1 TIPO3: _____
24.3.2 Frequência de contato (01). Todos os dias (02). De 2-3 dias na semana (03). Algumas vezes na semana (04). Uma vez no mês (05) Apenas se requisitado	24.3.2 CONTATO3: _____
24.3.3 Nível de ajuda (01). Sempre disponível (02). Moderadamente (03).Raramente	24.3.3 AJUDA3: _____
24.3.4 Distância (01). Mesma casa (02). No raio de 1km (03) Na cidade (04). Outra cidade	24.3.4 DISTANCA3: _____
24.4 Pessoa 4	
24.4.1 Tipo de relação (01) Parente (02) Amigo (03) vizinho (04) Outros (ex. Prof. de saúde)	24.4.1 TIPO3: _____
24.4.2 Frequência de contato (01). Todos os dias (02). De 2-3 dias na semana (03). Algumas vezes na semana (04). Uma vez no mês (05) Apenas se requisitado	24.4.2 CONTATO3: _____

24.4.3 Nível de ajuda (01). Sempre disponível (02). Moderadamente (03).Raramente	24.4.3 AJUDA3: _____
24.4.4 Distância (01). Mesma casa (02). No raio de 1km (03) Na cidade (04). Outra cidade	24.4.4 DISTANCA3: _____
24.5.1 Pessoa 5	
24.5.1 Tipo de relação (01) Parente (02) Amigo (03) vizinho (04) Outros (ex. Prof. de saúde)	24.5.1 TIPO3: _____
24.5.2 Frequência de contato (01). Todos os dias (02). De 2-3 dias na semana (03). Algumas vezes na semana (04). Uma vez no mês (05) Apenas se requisitado	24.5.2 CONTATO3: _____
24.5.3 Nível de ajuda (01). Sempre disponível (02). Moderadamente (03).Raramente	24.5.3 AJUDA3: _____
24.5.4 Distância (01). Mesma casa (02). No raio de 1km (03) Na cidade (04). Outra cidade	24.5.4 DISTANCA3: _____
Informações básicas de saúde (Baseado no SF-36)	
As questões a seguir se referem ao seu estado de saúde e como você se sente em relação a vida que leva em geral. Se você ficar em dúvida sobre alguma das perguntas, tente pensar sobre como se sente com relação a sua saúde e a sua vida e tente responder da melhor maneira possível. No entanto, não gaste muito tempo pensando no assunto porque a melhor resposta é exatamente a mais imediata.	
25- Em geral, você diria que a sua saúde é:	25. SAUDE: _____
(1) Excelente (2) Muito boa (3) Boa (4) Razoável (5) Ruim	
26- Comparado a três meses atrás, você diria que sua saúde em geral, está:	26. COMPARA: _____
(1) Muito melhor que há 3 meses atrás (2) Um pouco melhor que há 3 meses atrás (3) Mais ou menos a mesma (4) Um pouco pior que há 3 meses atrás (5) Muito pior que há 3 meses atrás	
As questões a seguir se relacionam a atividades que você realiza em um dia normal da sua vida.	
27. A sua saúde limita de alguma maneira alguma das seguintes atividades? Se for o caso, quanto?	
27.A Atividades vigorosas como correr, levantar objetos pesados, fazer esportes (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27a1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27a. ATIVIGOR: _____ 27a1. ATIVGORS: _____
27b. Atividades moderadas como mover uma mesa, empurrar um móvel, varrer a casa (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27b1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27b. ATIVMOD: _____ 27b1. ATIVMODS: _____
27c. Carregar ou levantar as compras (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27c1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27c. CARCOMP: _____ 27c1. CARCOMPS: _____
27d. Subir vários degraus de escada (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27d1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27d. VARDEGR: _____ 27d.1 VARDEGRS: _____

27e. Subir um degrau de escada (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27e1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27e. UMDEGR: _____ 27e.1 UMDEGRS: _____
27f. Curvar, agachar, alcançar algo no alto (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27f1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27f. CURGALTO: _____ 27f.1 GRAGALTO: _____
27g. Andar mais de 1 km (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27g1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27g. ANDAR1KM: _____ 27g1. 1KM: _____
27h. Andar meio km (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27g1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27h. AND500M: _____ 27h1. 500m: _____
27i. Andar 250 m (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27g1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27i. AND 250M: _____ 27i1. 250M: _____
27j. Tomar banho ou se vestir (0) Não (1) Sim (9) Não sabe. (SE RESPOSTA NÃO/NÃO SABE, PULAR PARA PERGUNTA SEGUINTE) 27g1 Se sim, grau de limitação: (1) MUITO (2) POUCO	27j. BANVEST: _____ 27j1. GBANVEST: _____
28 – Durante as últimas 2 semanas, quantas vezes você teve qualquer um dos seguintes problemas com seu trabalho ou com qualquer atividade do seu dia-a-dia como resultado do seu estado de saúde? Indique apenas uma das opções em cada linha.	
(01) Todo Tempo (02) Quase Sempre (03)Algumas Vezes (04) Às Vezes (05) Nunca	
28a. Diminuir o tempo que passa no trabalho ou fazendo as atividades normais	28a. TEMTRA: _____
28b. Fazer menos tarefas do que você faz	28b. MENOSTAR: _____
28c. Não conseguir fazer alguma das tarefa	28c. NCONSGTA: _____
28d. Ter dificuldade em fazer as suas tarefas	28d. DIFCTAR: _____
29- Durante as últimas 2 semanas, quantas vezes você teve problemas com seu trabalho ou suas atividades normais como resultado de qualquer problema emocional (como estar deprimido ou ansioso)? Indique apenas uma das opções em cada linha.	
(01) Todo Tempo (02) Quase Sempre (03)Algumas Vezes (04) Às Vezes (05) Nunca	
29a. Diminuir o tempo que passa no trabalho ou fazendo as atividades normais	29a. TEMTRA: _____
29b. Fazer menos tarefas do que você faz	29b. MENOSTAR: _____
29c. Não conseguir trabalhar ou executar suas tarefas com o mesmo cuidado	29c. TARCUIDA: _____
30- Durante as 2 últimas semanas, quanto o seu estado de saúde ou seus problemas emocionais interferiram com suas atividades sociais relacionadas a família, vizinhos e amigos? Por favor, indique apenas uma opção. (1) Nem um pouco (2) Um pouco (3) Medianamente (4) Muito (5) Extremamente	30. SAUPROB: _____
31- Qual a quantidade de dor você sentiu nas últimas 2 semanas? (1)Nenhuma (Pular para questão 33) (2) Muito fraca (3) Fraca (4) Moderada (5) Forte (6) Muito forte	31. QUANTDOR: _____

32- Durante as 2 últimas semanas, quanto a sua dor interferiu com seu trabalho ou suas atividades normais (incluindo fora e dentro de casa)? Indique apenas uma opção. (1) Nem um pouco (2) Um pouco (3) Moderadamente (4) Muito (5) Extremamente	32. DORTRAB: _____
33- Estas perguntas se referem a como você se sente e como esta a sua vida nas últimas duas semanas. Para cada pergunta, indique apenas uma resposta que esteja perto do que você sentiu.	
Quantas vezes nas últimas duas semanas você:	
(1) Todo o tempo (2) Quase sempre (3) Várias vezes (4) Algumas vezes (5) Às vezes (6) Nenhuma	
a. se sentiu cansado da vida	33a. VIDACANS: _____
b. se sentiu muito nervoso	33b. MUINERVO: _____
c. se sentiu muito desanimado	33c. DESANIMO: _____
d. se sentiu calmo e tranquilo	33d. CALMOTRA: _____
e. se sentiu cheio de energia	33e. ENERGIA: _____
f. se sentiu deprimido	33f. DEPREME: _____
g. se sentiu muito exausto	33g. EXAUSTO: _____
h. se sentiu uma pessoa feliz	33h. FELIZ: _____
i. se sentiu cansado	33i. CANSADO: _____
Hábitos Comuns	
34 – Fumo	
34a. Você fuma atualmente ? (0) Não (1) Sim	34a. FUMA: _____
34b. Você já fumou? (0) Não (Se não pular para a questão 35) (1) Sim Se sim, quando você parou de fumar? Ano: _____	34b. FUMOU: _____ 34b1. ANO: _____
34c. Por quantos anos você fumou? Número de anos: _____	34c. NANOS: _____
34d. Quantos cigarros/dia você fumou ou fuma ainda? _____	34d. QTCIGAR: _____
Alimentação	
35 – Quais das seguintes bebidas você consome e quantos copos por dia ou por semana? (1) Por dia (2) Por semana (3) Por mês (4) Nunca	
35a – água (0) Não (Vá para a questão seguinte) (1) Sim 35a1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35a2. número de copos ingeridos: _____	35a. AGUA: _____ 35a1. FREQUAG: _____ 35a2. COPAGUA: _____
35b – suco (0) Não (Vá questão seguinte) (1) Sim 35b1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35b2. número de copos ingeridos: _____	35b. SUCO: _____ 35b1. FREQSUCO: _____ 35b2. COPSUCO: _____
35c – refrigerante (0) Não (1) Sim 35c1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35c2. número de copos ingeridos: _____	35c. REFRI: _____ 35c1. FREQREFR: _____ 35c2. COPREFRI: _____
35d – cerveja (0) Não (1) Sim 35d1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35d2. número de copos ingeridos: _____	35d. CERVEJA: _____ 35d1. FREQCERV: _____ 35d2. COPCERVA: _____

35e – cachaça ou destilado (0) Não (1) Sim 35e1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35e2. número de copos ingeridos: _____	35e. CACHA: _____ 35e1. FREQCACH: _____ 35e2. COPCACHA: _____
35f – vinho (0) Não (1) Sim 35f1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35f2. número de copos ingeridos: _____	35f. VINHO: _____ 35f1. FREQVINH: _____ 35f2. COPVINHO: _____
35g – outra bebida alcoólica (0) Não (1) Sim 35g1. Se sim, frequência? (1) Diariamente (2) semanalmente (3) mensalmente 35g2. número de copos ingeridos: _____	35g. BEBAL: _____ 35g1. FREQBEB: _____ 35g2. COPBEBAL: _____
PERGUNTAS ADICIONAIS DO QUESTIONÁRIO PARA INDIVÍDUOS ACIMA DE 60 ANOS	
Atividades do dia a dia	
Para as questões abaixo, indique o que você faz de fato e não o que você é capaz de fazer.	
Comer	
36- Você geralmente se alimenta sem ajuda de alguém? (0) Não (1) Sim (Vá para a questão 37)	36. ALIMENT: _____
36a . Há quanto tempo você precisa de ajuda de alguém para ajudá-lo a se alimentar? (1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica	36a. TEMPO: _____
37 – Levantar-se da cama	
37. Você normalmente levanta-se da cama sem ajuda? (0) Não (1) Sim (Vá para a questão 38)	37 . LEVCAMA: _____
37a. Há quanto tempo você precisa de ajuda para levantar-se? (1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica	37a. TEMPO: _____
38 – Vestir-se	
38. Você precisa de ajuda de alguém para se vestir? (0) Não (Vá para a questão 39) (1) Sim	38. VESTIR: _____
b. Há quanto tempo você precisa de ajuda para vestir-se? (1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica	38ª. TEMPVEST: _____
Ir ao banheiro	
39- Você normalmente vai ao banheiro sem ajuda? (0) Não (1) Sim (Vá para questão 40)	39. BANHEIRO: _____
39a. Há quanto tempo você precisa de ajuda para ir ao banheiro? (1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica	39ª. TEMPBANH: _____
Tomar banho	
40- Você normalmente toma banho sem ajuda? (0) Não (1) Sim (Vá para questão 40)	40. BANHO: _____

<p>40a. Há quanto tempo você precisa de ajuda para tomar banho?</p> <p>(1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica</p>	<p>40a. TEMBANHO: _____</p>
<p>41. – Você sofre de incontinência urinária?</p>	
<p>41a. Você já teve incontinência urinária?</p> <p>(0) Não (Encerrar Questionario) (1) Sim</p>	<p>41a. INCONT: _____</p>
<p>41b. Você usa cateter uretral ou fralda?</p> <p>(0) Não (1) Sim (8) Não se aplica</p>	<p>41b. CATEFRAL: _____</p>
<p>41c. Por quanto tempo você faz uso de cateter ou fralda?</p> <p>(1) Menos de um ano (2) 1-4 anos (3) 5-9 anos (4) 10 anos ou mais (8) Não se aplica</p>	<p>41c. TEMPCAT: _____</p>

ANEXO 3

O Recordatório Alimentar de 24 horas

Data: ____/____/____

Nome: _____ Sexo: F () M()

() Aplicação 1 () Aplicação 2 () Aplicação 3

Atividade Física:

() leve () moderada () Intensa Qual? _____

Periodicidade: _____
—

Duração: _____
—

Faz uso de medicamento diurético: () Sim () Não () Não sabe informar

Qual medicamento? _____

DIETA HABITUAL/RECORDATÓRIO 24h

Refeição	Alimentos	Medidas Caseiras	Peso (g)
Desjejum Horário: _____ Local: _____			
Colação Horário: _____ Local: _____			
Almoço Horário: _____ Local: _____			
Lanche da Tarde Horário: _____ Local: _____			
Jantar Horário: _____ Local: _____			
CEIA Horário: _____ Local: _____			

Questionário de Frequência Alimentar

	Quantidade	Nunca ou < 1 mês	1-3 por mês	1 por sem.	2-4 por sem.	5-6 por sem.	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
I. Leite e produtos lácteos										
1. Leite integral										
2. Leite desnatado ou semi-desnatado										
3. Creme de leite										
4. Iogurte natural/ polpa										
5. Queijos brancos										
6. Queijos amarelos										
II. Carnes, pescados e ovos										
7. Ovo (frito/ mexido/ poché)										
8. Frango (cozido/ assado/ frito)										
9. Carne bovina (bife/ panela)										
10. Estrogonofe										
11. Panqueca de carne										
12. Hambúrguer/ cheeseburger										
13. Carne suína (lombo/ bisteca)										
14. Fígado										
15. Vísceras de frango (miúdos)										
16. Mortadela, presunto										
17. Lingüiça/ salsicha										
18. Bacon/ toucinho										
19. Peixe (cozido/ assado/ frito)										
20. Atum/sardinha em conserva										
21. Camarão										
III. Verduras e legumes										
22. Alface/ escarola										

	Quantidade	Nunca ou < 1 mês	1-3 por mês	1 por sem.	2-4 por sem.	5-6 por sem.	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
23. Acelga										
24. Repolho										
25. Agrião/ Almeirão										
26. Brócolis/ couve-flor/ couve										
27. Tomate										
28. Cenoura										
29. Abóbora										
30. Alho/ cebola										
31. Legumes: jiló/ berinjela/ pepino										
32. Legumes: abobrinha/ beterraba										
IV. Frutas e sucos naturais										
33. Laranjas/ Mexerica										
34. Suco de laranja										
35. Suco de limão										
36. Bananas										
37. Suco de maracujá										
38. Abacaxi/ Suco										
39. Maça/ Pêra										
40. Mamão papaya/ Suco										
41. Morangos										
42. Caqui										
43. Abacate										
44. Melão/Melancia/ Suco										
45. Suco de caju										
46. Suco de acerola										
47. Uvas										

48. Manga/ Suco										
	Quantidade	Nunca ou < 1 mês	1-3 por mês	1 por sem.	2-4 por sem.	5-6 por sem.	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
49. Outras Frutas: pêssego/ figo/ ameixa										
50. Oleaginosas (amendoim, castanhas)										
51. Azeitonas										
V. Pães cereais, tubérculos e leguminosas										
52. Pão francês										
53. Pão de forma/ caseiro/ bisnaga										
54. Pão integral/ diet										
55. Cereais matinais										
56. Milho verde										
57. Batata cozida/ purê/ assada										
58. Batatas fritas										
59. Arroz cozido										
60. Polenta										
61. Mandioca cozida										
62. Farinhas/ farofa										
63. Macarrão/ massas/ instantâneo										
64. Feijão cozido										
65. Feijão branco/ ervilha/ lentilha										
VI. Óleos e gorduras										
67. Óleo de soja/ milho/ canola/ girassol										
68. Margarina										
69. Manteiga										
VII. Doces, salgadinhos e guloseimas										
70. Chocolates variados										

71. Achocolatado										
72. Sobremesas cremosas (pudim/ manjar)										
73. Doce de frutas (calda/ barra)										
	Quantidade	Nunca ou < 1 mês	1-3 por mês	1 por sem.	2-4 por sem.	5-6 por sem.	1 por dia	2-3 por dia	4-5 por dia	6+ por dia
74. Sorvetes cremosos										
75. Doces de bar (amendoim/ leite/ suspiro)										
76. Salgadinhos de bar (esfiha/ coxinha/ pastel)										
77. Biscoito salgado água e sal/ cream cracker										
78. Biscoito doce maisena /leite/ maria										
79. Biscoito doce recheado										
80. Bolo simples										
81. Bolo/torta recheado/ com frutas										
82. Torta salgada										
83. Pizza										
84. Pão de queijo										
VIII. Bebidas										
85. Refrigerantes (cola/ limão/ laranja/ guaraná)										
86. Cerveja										
87. Vinho										
88. Outras bebidas alcoólicas: pinga/ uísque										
89. Chá mate/ preto infusão										
90. Café (com açúcar/ sem açúcar)										
91. Suco artificial em pó										
IX. Preparações e Miscelâneas										

92. Açúcar para adição										
93. Sopa legumes/ feijão/ canja										
94. Molho de Maionese										
95. Salada de legumes com maionese										
96. Molhos industrializados: catchup/ mostarda										
97. Molho de tomate										
98. Extrato de soja										

ANEXO 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – Identificação do Responsável pela execução da pesquisa:

Título: Estudo de fatores imunológicos, genéticos e da microbiota associados ao envelhecimento saudável em populações brasileiras e italianas. Fases I e II
Pesquisador Responsável: Dra. Ana Maria Caetano de Faria
Instituição de Origem da Pesquisa: Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Bioquímica e Imunologia Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG Tel: 31-3409-2630 / 2640 Fax: 31- 3409-2640
Comitê de Ética em Pesquisa Comitê de Ética UFMG Campus UFMG Av. Antônio Carlos, 6627 Belo Horizonte, MG

Informações ao participante ou responsável

1. Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “Estudo de fatores imunológicos, genéticos e da microbiota associados ao envelhecimento saudável em populações brasileiras e italianas. Fase I e II”. O tempo de duração desta pesquisa será de 24 meses tendo início em 15/03/2012 e término em 15/12/2013.
2. Essa pesquisa tem como objetivo entender quais os fatores biológicos estão relacionados ao envelhecimento saudável na população brasileira.
3. O envelhecimento está geralmente associado ao aparecimento de doenças inflamatórias crônicas, ao aumento da suscetibilidade a infecções e à redução na capacidade de realizar várias atividades físicas e mentais. No entanto, algumas pessoas envelhecem sem doenças e preservam muitas dessas capacidades. Chamamos esse processo de “envelhecimento saudável”.
4. Um pesquisador, através de um questionário, fará perguntas a respeito da sua saúde, dos seus hábitos, da sua moradia e da sua família. Você poderá se recusar a responder qualquer pergunta que por ventura lhe causar algum constrangimento.
5. Além do questionário, serão necessários alguns testes para verificar o seu estado de saúde. Esses testes serão feitos a partir da coleta de materiais biológicos: fezes (para o exame de parasitoses intestinais), urina (para verificar os componentes secretados na urina) e de sangue. As fezes e a urina serão coletados por você mesmo(a) e serão fornecidas instruções do profissional da saúde sobre como coletar esse material. Os testes parasitológicos nas fezes serão realizados no laboratório da UNIVALE. O teste na urina será realizado pelo laboratório da UNIMED de Governador Valadares. O sangue será coletado do seu braço e será utilizado para a realização de outros testes como, por exemplo, o hemograma (que mostra a contagem dos glóbulos vermelhos e brancos), o teste de ELISA para medir anticorpos e outras substâncias presentes no sangue como as citocinas que irão mostrar como o seu organismo se defende de infecções, por exemplo. Será necessário coletar cerca de 20 ml do seu sangue.
6. O sangue será coletado por profissional treinado que usará jaleco e luvas. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável. A coleta de sangue pode causar leve dor local podendo, em alguns casos, levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento. Poderão ocorrer outros tipos de desconforto a você como tonturas e desmaios, ou desconfortos psíquicos como ansiedade e medo. Isto será levado em conta

no momento da coleta e, caso seja necessário, será providenciada uma coleta na posição deitada para evitar qualquer tipo de desconforto, constrangimento ou aborrecimento.

7. Medidas de biossegurança são adotadas em todos os procedimentos realizados neste projeto visando salvaguardar o coletor de qualquer possibilidade de contaminação e também evitar injúria ao paciente no ato da coleta de sangue por punção venosa. Serão observadas medidas de segurança também para acidentes cortantes ou perfurantes e os riscos de contaminação são minimizados com a realização de antissepsia do ponto de punção, assepsia das mãos entre o atendimento dos pacientes e imunização ativa contra tétano, difteria e hepatite B para todos os profissionais de saúde envolvidos neste projeto.

8. Caso os resultados dos exames laboratoriais sejam positivos para parasitoses, você será orientado adequadamente e encaminhado para tratamento gratuito. Os resultados relativos ao seu hemograma (contagem de células no sangue) e de urina também serão entregues a você e fornecidas explicações com relação a esses resultados.

8. Você não é obrigado a fazer os exames ou a doar seu sangue. A recusa não lhe causará nenhum prejuízo.

9. A sua participação ou da pessoa pelo qual você é responsável, como voluntário, não lhe conferirá nenhum privilégio, ou seja, a pessoa não receberá nenhum dinheiro pela participação. Entretanto, lhe serão garantidos todos os cuidados necessários para sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem estar físico e psicológico e você poderá retirar-se desta pesquisa em qualquer momento, sem que isto lhe cause qualquer prejuízo ou constrangimento.

10. Este estudo contribuirá para a identificação de fatores biológicos responsáveis pelo envelhecimento saudável na população brasileira e será importante para a elaboração de futuras políticas de saúde que visem criar condições para que esse envelhecimento saudável esteja ao alcance de todos.

11. Serão garantidos o silêncio e privacidade das informações, sendo reservado a você ou ao seu responsável o direito de não se identificar.

12. Na apresentação dos resultados seu nome não será citado, nem daquele pelo qual você é responsável. Sua identificação será mantida em sigilo durante todo o estudo e apenas a coordenadora do projeto manterá essa informação guardada em arquivo seguro.

13. A sua participação é importante, pois auxiliará na busca dos fatores envolvidos no envelhecimento saudável e na elaboração de medidas que ajudem na sua promoção junto à população brasileira.

Se você concordar em participar do estudo assine seu nome abaixo. Se você for menor de idade (18 anos), o seu responsável deverá assinar o termo de consentimento por você.

Local/ Data: _____

Nome do Participante: _____

Responsável (se necessário): _____

Coordenadora do Projeto:

Dra Ana Maria Caetano de Faria: _____

Depto. Bioquímica e Imunologia – ICB – UFMG - Tel: 31-3409-240 / Tel. celular: 31-3491-0793

Pesquisadora responsável da Instituição Universidade Vale do Rio Doce (UNVALE)

Dra. Lucia Alves de Oliveira Fraga: _____

Núcleo de Pesquisa em Imunologia - UNIVALE – Tel: 33- 3279-5983/ Tel. Celular: 33- 8862-9849

ANEXO 5

FROM BIRTH TO SENESCENCE: CYTOKINE PRODUCTION BY ADAPTATIVE AND INNATE IMMUNE CELLS IN BRAZILIAN INDIVIDUALS.

GABRIELA SILVEIRA-NUNES¹; ELAINE SPEZIALI²; ANDREA TEIXEIRA-CARVALHO²; DANIELLE M VITELLI-AVELAR²; RENATO SATHLER-AVELAR²; TACIANA FIGUEIREDO SOARES³; MARIA LUIZA-SILVA²; VANESSA PERUHYPE-MAGALHÃES PASCOAL^{2,4,5}; DANIEL GONÇALVES CHAVES²; GUSTAVO EUSTÁQUIO BRITO-MELO⁶; GLENDA MEIRA CARDOSO²; ERIC BASSETTI SOARES^{2,3}; SILVANA MARIA ELÓI-SANTOS^{2,3}; ROSÂNGELA TEIXEIRA³; DULCIENE MAGALHÃES QUEIROZ³; RODRIGO CORRÊA-OLIVEIRA⁴; ANA MARIA CAETANO FARIA¹; OLINDO ASSIS MARTINS-FILHO²

¹ Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

² Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ

³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

⁴ Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ

⁵ Laboratório de Pesquisas Clínicas, Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ

⁶ Departamennto de Farmácia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Key words: aging, cytokine, adaptive immune cells, innate immune cells

Correspondent Author: Dr. Ana Maria Caetano Faria

Laboratório de Imunobiologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia

Instituto de Ciências Biológicas, Avenida Antônio Carlos 6627

Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901 (Brazil)

Tel./Fax +55 31 3409 2640, E-Mail anacaetanofaria@gmail.com

ABSTRACT

Aging is a complex phenomenon characterized by changes in the physiological systems of the body. One of the most important changes occur in the immune system. It is called immunosenescence and involves changes in the innate and the adaptive immune systems. The impact of age-related changes on cytokine global profiles of healthy Brazilian individuals were characterized using short-term cultures of whole blood cells samples and single-cell flow cytometry. We report the global profile of cytokine production by acquired and innate immune cells from individuals at several age intervals spanning a lifetime period (0–85 years). Innate immune system showed its importance in the immune profile of Newborns and elderly individuals, specially driven by Neutrophils and NK-cells. The Adult groups presented the balanced profile that represents a mature immune system with equal contribution of both compartments (innate and adaptive immune system) and both categories of cytokines (inflammatory and regulatory). Taken together, our results support the hypothesis that aging was not associated with a progressive decline in cytokine production by all leukocyte subsets but was characterized by distinct fluctuations of cytokines produced at various time points during life.

INTRODUCTION

Immunosenescence does not involve a simple unidirectional decline in all functions, but rather a remodeling of biological systems during the aging process. In this sense, many immunological activities are well preserved in the healthy elderly and they may compensate for other functions that are impaired^{1,2,3}. In the past decade, a new approach to the study of aging emerged from the data collected from centenarians. The concept of successful or healthy aging comes from these studies and it eliminated the confusion between aging and age-related disorders.

Aging is associated with several alterations in the phenotype, repertoire and activation status of leukocytes as well as in the cytokine profile produced by these cells. This complex age-related remodeling of the immune system is responsible for the profound changes within the cytokine network³⁻⁸. Cytokines are a key component in the communication among immune cells and they are responsible for differentiation, proliferation and survival of lymphoid cells, playing an important role in immune responses and inflammation. The remodelling of the cytokine network seems to be responsible for a chronic proinflammatory status, known as “inflammaging”^{3,5}. Inflammaging has been described as a combination of dysfunctional immunity with a state of low grade chronic inflammation and it has been considered as an universal phenomenon associated with frailty and morbidity in the elderly^{3,8-11}. This progressive increase in pro-inflammatory status is one of the major characteristics of immunosenescence¹³⁻¹⁵

Several aging-associated immunological alterations have been already described in medical literature, mostly in the T-cell compartment. They include involution of the thymus, reduction in the number of naïve T cells with a parallel increase of oligoclonally

expanded CD4⁺ T cells with a memory phenotype, reduced potential to produce IL-2 and loss of CD28 expression¹⁶⁻¹⁸. Adaptive immunity undergoes severe deterioration with age and represents the main problem in the elderly. However, evidence accumulated over the last decade supports the hypothesis that aging also has a profound impact on innate immunity, which in turn markedly influences health and longevity of older people^{3,19-21}.

In the complex scenario of immunosenescence, it has been generally accepted that some aspects of innate immunity, e.g., phagocytosis and natural killer (NK) cell cytotoxicity, remain largely unaffected²⁰⁻²². Innate immune responses are more resistant to change and natural killer (NK) cells are well preserved in healthy elderly subjects. In fact, there is an age-related increase in CD16⁺ CD57⁻ cells with high cytotoxicity capacity. This increase in NK cells has been correlated with successful aging^{12,22-24}. Our group reported a significant increase in frequency of CD16⁺ IFN- γ ⁺ NK cells in aged individuals in schistosomiasis endemic areas of Brazil who were protected from schistosome infection. Therefore, a high frequency of IFN- γ ⁺ NK cells correlated with “healthy aging” in endemic areas¹².

Studies in aged mice showed functional decline of monocytes and macrophages, low expression level of Toll-like receptors from activated splenic and peritoneal macrophages and altered secretion of several chemokines and cytokines^{25,26}. Reduced class II major histocompatibility in aged macrophages also contribute to impaired proliferative response of activated peripheral T lymphocytes^{21,27-29}.

Although the elderly preserve the number and phagocytic capacity of neutrophils, other functional characteristics of these cells are altered during aging. Functions such as superoxide anion production, chemotaxis, and apoptosis are reduced^{19,30,31}.

In this sense, healthy immunosenescence is the net result of a continuous adaptation of the body to deteriorative changes occurring over time. According to this

hypothesis, body resources are continuously optimized, and successful immunosenescence must be considered a very dynamic process of remodeling^{32,33}.

Most of the studies investigating the influence of inflammaging in the elderly were obtained at particular age intervals and most of them come from Caucasian individuals from either Europe or the United States. Even among these reports, authors have observed variations and contrasting results as their samples vary demographically and geographically³⁴⁻³⁶. The study of various age groups should yield more meaningful data on immunosenescence that could be directly used by the geriatricians. This knowledge is essential for developing new treatments to restore or attenuate deregulated immune responses and assure a healthy longevity.

In this context, to evaluate how cytokine production is influenced by aging, both in humans and animal models, is essential to elucidate possible mechanisms of age-associated changes in immunity. The results of studies in this area are often contradictory and it is difficult to compare data among various studies owing to differences in experimental designs³⁷. Therefore, we described age-related changes in the frequency of cytokine-producing leukocyte populations in order to contribute to the establishment of new reference parameters for Brazilian populations. This study is part of a broad effort to understand some of the cellular factors involved with healthy aging.

METHODS

Study Population

The study population consisted of 181 healthy subjects: 35 children, 22 adolescents and 124 adults (age range 0-85 years). Blood samples were obtained from children visiting clinics for routine pediatric inspection. Adult samples were obtained from healthy individuals who accepted to participate in the study. Subjects were divided into 6 age categories: Newborn – 0 years (n= 12); Children – 6 – 10 years (n=23); Adolescent – 11 – 20 years (n=22); Adults - 21-50 (n=80); Middle Aged – 51 - 60 (n=22); Elderly - 61-85 (n=22). These age ranges were set based on the main physiological changes occurring during lifetime (birth, childhood, adolescence, young and middle adulthood, senescence) as well as similar patterns observed for the phenotypic markers acquired throughout life. According to previous studies of our group³⁴, these are representative age groups with homogenous behavior suitable to identify immunologically meaningful periods in life. These volunteers were all residents in the state of Minas Gerais (Southeast Brazil). Health conditions were evaluated by clinical examination as well as hematological and biochemical tests. The exclusion criteria for both populations were: infections, acute or chronic inflammation, autoimmune diseases, heart disease, undernourishment, anemia, leucopenia, mood disorders, neurodegenerative disease, neoplasias and use of hormones (steroids) and drugs (alcohol, antidepressants, immunosuppressants, anticoagulants). Children were excluded of the study if they showed any evidence of congenital disease, infection, immunological disorder or were taking any concomitant medications. Written informed consent forms were obtained from each participant, their parents or guardians prior to their inclusion in our study. This work was approved by the Ethical Committees of FIOCRUZ (Ministry of Health, Belo Horizonte, Brazil) as well as the National Research Ethics Committees (CONEP) of Brazil.

Short-term Whole Blood Culture and Intracytoplasmic Cytokine Staining

Aliquots of 500 μ l of peripheral blood were placed in 5ml polypropylene tubes containing 500 μ l RPMI-1640 added and incubated for six hours at 37°C and 5% CO₂. Next, 10 μ l Brefeldin A (BFA; Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) (10 mg/ml final concentration) was added and incubated for four hours at 37°C and 5% CO₂. Then, 110 μ l ethylenediamine tetraacetic acid 20mM (EDTA; Sigma Chemical Company), (final concentration of 2mM) solution was added. Tubes were incubated for 15minutes at room temperature. Next, 4mL of PBS-W (cell wash solution) was added and samples were centrifuged for 10 minutes at 400g and 18°C. Supernatants were collected and aliquots stained with fluorescent-labeled anti-human cell surface monoclonal antibodies (to CD4, CD8, CD14, CD16 and CD19) for 30 minutes at room temperature and protected from light. After membrane staining, erythrocyte lysis, and leukocytes fixation, cell suspensions were permeabilized with PBS-P (PBS 0,05M pH 7,4 containing 0.5% BSA, 0.1% sodium azide and 0.5% saponin: SIGMA) and aliquots incubated for 30 minutes at room temperature, in the dark, with fluorescent-labeled anti-cytokine monoclonal antibodies to IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α and IFN- γ (BD-Pharmingen, San Jose, CA). After intracytoplasmic cytokine staining, leucocytes were washed with PBS-W and fixed in fixative solution Macs Facs Fix (MFF). Samples were analyzed by flow cytometry. Production of TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10 by CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells, and the production of TNF- α , IL-4 and IL-10 by CD19⁺ B cells. Additionally, production of TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 by neutrophils, production of TNF- α and IL-10 by monocytes and production of TNF- α , IFN- γ and IL-4 by NK cells was analyzed.

Flow cytometry acquisition and analysis

Flow cytometry acquisition and analysis were performed in a FACScalibur™ equipped with a four-color detection system (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), using the CELLQUEST software (Franklin Lakes, NJ, USA). After acquiring 30,000 events/tube, distinct gating strategies were used to analyze the different cytokine-expressing leukocytes subsets, including innate immune cells (neutrophils, monocytes and NK cells) and adaptive immune cells (CD4+, CD8+ T-cell subsets and B-cells). Selective analysis of neutrophils was performed by establishing a specific scatter gate using the dot plot distribution of anti-CD16-FITC and laser side scatter (SSC) to discriminate the neutrophils as SSC high CD16 high+. Analysis of monocytes was performed using the dot plot distribution of anti-CD14-TC and SSC to discriminate the monocytes as SSC int CD14 high+ cells. Selection of NK cells, T-cell subsets and B-cells was performed by gating lymphocytes on forward scatter (FSC) versus SSC dot plot distribution, followed by analysis based on anti-CD16-FITC, anti-CD19-FITC, anti-CD8-FITC or anti-CD4-TC labelling. Following the selection of leucocyte subsets, frequency of cytokine positive cells was determined using quadrant statistics over FL-1/anti-cell surface marker-FITC or FL-3/anti-cell surface marker-TC versus FL-2/anti-cytokine-PE dot plot distribution. Results were expressed as percentages of cytokine positive cells for different gated leucocyte subpopulations analyzed.

Cytokine Signature Analysis

Cytokine-mediated immune response elicited by leukocytes in each age group was assessed after short term *in vitro* culture with no specific antigenic stimulation. Analysis of the intracytoplasmic cytokine profile of peripheral blood leukocytes initially yielded

the percentage of cytokine positive cells. The cytokine profiles produced by leukocytes were assessed to identify low (\leq global median) and high ($>$ global median) frequency of cytokine-producing cells using the global median of each cytokine as a cut-off. For the calculation of the global median the whole universe of data obtained for the groups was considered. Leukocyte subpopulations assessed included neutrophils (NEU), monocytes (MON), NK cells as well as lymphocyte subsets and the global median of each subpopulation was described in **Table 1**. This strategy allows multiple comparative analyzes among groups, neither of which is excluded from the analysis. The high frequency of cells producing cytokines was used to evaluate the overall cytokine patterns from healthy individuals categorized by age ranges.

Comparative Data Analysis

The immune profile is represented as percentage of individuals with high frequency of cytokine-producing innate and acquired immune cells. Relevant differences were considered when the percentage of individuals with high cell frequency producing a given cytokine emerged outside the 50th percentile (Figure 1 and 2). This approach showed to be relevant to detect subtle changes in cytokine signatures not detectable by conventional statistical approaches. Then, considering the relevant production of cytokines, Spearman correlation was performed to evaluate increase or decrease in frequency of cytokine-producing cells among age groups.

Radar Charts

Radar charts were used to summarize the proinflammatory (■) versus regulatory (■) cytokine signatures in a range of leukocyte subsets of innate and adaptive immunity for each age group. This analysis highlights the contribution of different leukocytes subsets

for the global balance of cytokines. On radar charts, each axis represents the frequency (%) of volunteers showing high frequency of cytokine-producing cells. The values of each axis can be connected to form a central polygonal area that represents the proinflammatory versus regulatory global balance. Increase or decrease of the central polygonal area reflects either a higher or lower contribution of proinflammatory versus regulatory profile for each age group.

Ascendant cytokine profile

The high cytokine producing-cell strategy was also used to create, for each age group, an ascendant profile that allows to analyze the behavior and hierarchy of cytokine-producing immune cells through life. In this analysis, functional cytokine categorization was used: Inflammatory cytokines – red bars (TNF and IFN- γ) and regulatory cytokines – blue bars (IL-4, IL-5 and IL-10). Only those that had more than 50% of high frequency of cytokine-producing cells in the group were considered as relevant.

RESULTS

To address the question of how aging influences the global profile of cytokine production by acquired and innate immune cells, healthy individuals were categorized in carriers of either low or high frequency of cytokine-producing cells as previously described by

Luiza-Silva and co-workers³⁸. This allowed calculation of the percentage of individuals with high frequency of cytokine-producing cells for each age group. To assess a functional cytokine profile, we classified cytokines as proinflammatory (TNF and IFN- γ) and regulatory (IL-4, IL-5 and IL-10) according to its functional characteristics during the aging process. We took into account for this classification that Th1 cytokines (TNF and IFN- γ) were mostly involved in chronic inflammatory disorders associated with aging (such as cardiovascular, autoimmune and degenerative diseases)³⁹⁻⁴¹. In addition, cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10 usually predominate in tolerogenic compartments such as gut mucosa and maternal-fetal interface⁴²⁻⁴⁴.

There are distinct variations in frequency of cytokine-producing leukocyte subsets throughout life

To overview the production of proinflammatory and regulatory cytokines throughout life, we performed an evaluation of the cytokine profile produced by leukocyte subsets from the innate (Neutrophils, Monocytes and NK-cells) and adaptive (CD4+ T-cells, CD8+ T-cells and B-cells) immune compartments. In this analysis, individuals were categorized as carriers of either low or high frequency of cytokine-producing cells, using the global median as a cut-off as previously described³⁸, so that it was possible to calculate the percentage of individuals with high frequency of cytokine-producing cells for each age group.

Of note, in the innate cytokine profile, there was the significant decrease of TNF-producing neutrophils from childhood to adulthood when it reached a plateau. IFN- γ and IL-4 decreased early in life until childhood. On the other hand, IL-10-producing neutrophils increased during adulthood (adult and middle aged individuals). TNF-producing monocyte frequency increased from birth until childhood, then, maintained

high during adolescence and adulthood and decreasing in the elderly. Interestingly, monocytes maintained a low production of IL-10 during early life and shifted towards a progressive high production from adulthood to senescence. IFN- γ -producing NK-cells and IL-4-producing NK-cells increased in frequency from adult and middle-aged groups, respectively, until senescence (Figure 1).

Frequency of TNF-producing CD4 T-cells had an increase during the aging process (significantly from adulthood to senescence), while TNF-producing CD8 T-cells and B-cells decreased their frequencies. Regarding IFN- γ production, only producing CD4 T cells changed: they increased from adulthood to middle age. It could be observed a significant decrease of IL-4-producing CD8 T cells throughout life (specially from adolescent to elderly groups). An interesting pattern could be found in the profile of IL-5-producing T-cells. At birth, there was a high frequency of both IL-5-producing CD4+ cells and CD8+ cells; then, these frequencies decreased during childhood to increase again in adolescence, being maintained at approximately 50% of frequency of high cytokine-producing cells during adulthood. From the fiftieth decade of life to senescence, the frequency of IL-5-producing CD4 and CD8 T cells increased further. A remarkable finding is that all IL-10-producing lymphocytes (T and B-cells) had their frequency decreased from adolescence to senescence (Figure 2).

Overall profiles of high-producers of proinflammatory and regulatory cytokine in innate and adaptive immune compartments vary throughout life.

In order to further characterize the cytokine pattern from healthy individuals categorized by age ranges, we have constructed radar charts to characterize the frequency of high proinflammatory and regulatory cytokine producers in each age group and an ascendant

graph to characterize the hierarchical contribution of cytokine-producing cell types to the cytokine profile of each age group (Figure 3 and 4).

Our data demonstrate that the overall cytokine pattern of newborns was characterized by a prominent participation of proinflammatory responses of the innate immune compartment (figure 3), especially driven by TNF and IFN- γ from neutrophils (figure 4). This profile seems to be counterbalanced by a microenvironment of regulatory cytokines (mostly by IL-5-producing T-cells) (Figure 3 and 4)

According to our data, neutrophils had an important role in childhood. These innate cells, together with monocytes, produce large amounts of TNF, while neutrophils also produced high levels of IL-10, creating a compensatory circuit of cytokines (Figure 3 and 4).

In the adolescent (11 to 20 years), we could observe a shift in the composition of the cytokine milieu. In this age group, there was a predominance of adaptive immune responses, with participation of proinflammatory cytokines such as TNF from T and B cells, and IFN- γ from CD4 and CD8 T cells with a contribution of regulatory cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-10 produced by T and B lymphocytes. Innate immune cells also influence the adolescent profile: TNF and IFN- γ produced by neutrophils and NK-cells, as well as IL-4 production by NK-cells (Figure 3 and 4).

Interestingly, adults presented a profile well balanced between innate and adaptive immune responses with an equal contribution of proinflammatory and regulatory cytokine-producing cells (Figure 3 and 4).

Another shift in the composition of the cytokine milieu could be observed from the fiftieth decade of life on. Middle aged group changed their profile from a balanced (seen in adulthood) to a profile higher contribution of innate compartment. Middle aged groups showed a high production of TNF, IL-4 and IL-10 on neutrophils, TNF and IL-10 on monocytes and IFN- γ on NK-cells. A prominent inflammatory profile is still present on

this group on the Adaptive compartment (TNF produced on CD4+ T-cells and B-cells, IFN- γ produced on CD4+ T-cells and IL-4 produced on CD4+T-cells and B-cells) (Figure 3 and 4).

The changes in overall cytokine pattern in the elderly group were characterized by balanced profile with a prominent contribution of the innate immune response (driven by IL-10-producing monocytes, IL-4-producing neutrophils, TNF- and IFN- γ -producing neutrophils and NK-cells). Although innate immune cells are the most relevant element in the cytokine profile of this age group, the contribution of adaptive immune cells could still be identified as IL-5- and TNF-producing T-cells and IL-4-producing CD4 T cells.

DISCUSSION

Aging influences the entire physiology of an organism, resulting in changes on functions at the molecular, cellular and systemic levels. Age-related physiological changes can be very well exemplified in the immune system, which is continuously remodeled over the life course. One of the main remodeling changes observed in the immune system during aging occurs in the network of cytokine production^{4,8,45}.

In this study, we evaluated the profile of cytokine produced by individuals from various age groups as a broad effort to better understand immunosenescence and to contribute for

the development of reference values for cytokine production by the major peripheral blood lymphocyte subpopulations through lifetime. Interestingly, we observed that aging was not associated with a progressive decline in cytokine production by all leukocyte subsets but was characterized by distinct fluctuations of cytokines produced at various time points during life. Furthermore, these variations were distinctive of each cell population examined.

The number of studies in this area is small and results are often contradictory. It is difficult to compare the data among various studies owing to differences in experimental design³⁷. According to some studies, an increase of the plasma level of a variety of cytokines, in particular pro-inflammatory cytokines and their soluble receptors, occurs with aging^{5,2,7}. To this regard, it has to be considered that the production of most cytokines is not confined to one cell type and thus it is difficult to identify the cellular sources that contribute to their plasmatic levels⁴⁶⁻⁴⁸. The technique of intracellular cytokine staining⁴⁹ offers the possibility of evaluating the contribution of different cells to the production of cytokine in heterogeneous cell populations. Then, it was possible to measure intracellular cytokines and cell surface markers simultaneously with the aim to identify specific subpopulations of human leukocytes producing a cytokine pattern and to characterize their cytokine production⁵⁰⁻⁵⁵.

We evaluated the cytokine pattern of adaptive immune cells (CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and B cells), considering that this arm of immune system is specially targeted during aging. As expected, some cytokines, such as IL-10, produced by T cells declined with aging. However, production of TNF and IFN-gamma by CD4⁺ T cells and IL-5 by both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were unaffected. Our group demonstrated that the frequencies of T cells changes during aging tend to form a curve, with maximum frequencies at the beginning of adulthood (19–40 years) and decreasing until elderly age. This was

particularly observed for CD4⁺ T cells. In contrast, the frequency of CD8⁺ T cells is preserved during aging and declined only in 41–65 and 61–75 age ranges³⁴. Results obtained from the analysis of 47 European subjects of different ages involved in the study of Alberti and coworkers (2006)⁸ indicated that the percentage of IFN-gamma-positive CD4⁺ T cells significantly decreased in naïve cells from both in old and nonagenarian individuals in comparison with young subjects while the percentage of TNF- α positive CD4⁺ T cells significantly decreased in activated/memory cells from old subjects in comparison with young ones. Differences on the methodology and age ranges could explain those distinct findings.

Immunosenescence studies in humans have mainly focused on the impairment of the T cell compartment. However, changes are not limited to T cells; B cells have been studied as well. These cells showed a decreased production of TNF and IL-10 in adults and in the elderly group^{13,56,57}. Our group has observed that frequencies of B cells decline in the 19-40 age group of Brazilian individuals and these data is compatible with the lower percentage of cytokine-positive B cells in adulthood³⁴.

Although changes in T and B cell functions were identified in healthy elderly, innate immune responses seem to be more resistant to age-associated changes¹. NK-cells are one of the cellular mediators of innate defense and have been extensively studied in the elderly. The number and cytotoxicity activity of NK cells are increased in healthy elderly and centenarians. Moreover, cumulative evidence in the last two decades supports the importance of NK cell activity in maintaining good health during aging. This is consistent with the well-preserved NK cell cytotoxicity in centenarians with other criteria of healthy status such as physical fitness, independence to perform daily activities, or adequate cognitive function^{19,22-24}. Our group reported a significant increase in frequency of CD16⁺ IFN-gamma⁺ NK cells in non-infected individuals who inhabit *S. mansoni*

endemic areas of Brazil, and these cells are maintained at higher frequency in subjects over 70 years old. This suggests that the healthy individuals (who remain non-infected in endemic area) are those who sustain a high frequency of IFN-gamma+ NK cells as they age¹². In accordance with that, our results demonstrated a higher production of type 1 (IFN-gamma) cytokine with aging, and also a counterbalancing type 2 (IL-4) cytokine production by NK-cells.

Different analysis could demonstrate the importance of the other innate immune cells in the immunosenescence process. Cellular components of the innate immune system, including neutrophils and macrophages, are the first to arrive at the site of injury. Their role is to initiate an inflammatory response, phagocytosis of the pathogen (in case of infection), recruit NK cells, and facilitate the maturation and migration of dendritic cells (DCs) that regulate and determine the nature of the T cell-mediated outcome¹⁹. Frequencies of TNF-, IFN-gamma- and IL-4-producing neutrophils decreased from birth to adulthood and were maintained until senescence. On the other hand, frequency of TNF+ monocytes had a high plateau at childhood and decrease only in senescence. Interestingly, the reduced frequency of IL-10 production by adaptive immune cells, there was a compensatory increase of IL-10+ cells from the innate compartment (neutrophils and monocytes).

Production of cytokines and their sources should not be evaluated alone during a complex process such as immunosenescence. The immune response is the result of several events that involves recruitment of cells, production of cytokines and chemotactic factors, establishment of immunoregulatory and proinflammatory factors. In this context, we performed a cytokine profile to assess a global picture of the immune response during aging. This kind of analysis took into account the importance of the environment to an efficient immune response. This alternative strategy has been used by our group in a

previous work³⁸, and it was used as an important tool for a better understanding of the mechanisms involved in the aging-associated immunological alterations.

Another important aspect of this study was the inclusion of a group of children. The childhood represents a critical period of immune development and there is a lack of data on the distributions of immune parameters in healthy children⁵⁸. We demonstrated that newborns had a high frequency of IL-5-producing T cells, while neutrophils producing type 1 cytokines predominated in the innate immune compartment, a profile that remained in children. Exposure to an increasingly diverse range of antigens during the first years of life could be responsible for the environmental driven type 1 response observed in the childhood period^{59,60}. These changes seem to promote a healthier immune profile, considering that a failure in suppressing exacerbated type 2 immune responses, and decreased capacity for production of type 1 cytokines during infancy are characteristic of individuals prone to atopic disease⁵⁹⁻⁶¹.

Adolescents (11 to 20 years) presented an immunological profile characterized by balanced frequencies of adaptive cells able to produce proinflammatory/regulatory. Adequate exposure to environmental antigens during infancy and the rise in sex hormones could explain the change into a robust and balanced immune profile characterized by a predominant contribution of cytokine-producing adaptive immune cells in adolescents.

The immune system reaches equilibrium in adulthood, when the cytokine profile was characterized by a balance between innate and adaptive compartment contribution, and between inflammatory and regulatory cytokines. Observing the overall cytokine production in individuals from the 25-51 age (Middle Aged) group, one could notice impairment of the cytokine production by adaptive immune cells and an expansion of innate immune compartment contribution to cytokine profile. It is widely accepted that T cells are specially targeted during immunosenescence. A number of factors have been

linked to the decline in T cell function with aging. Age-related thymic atrophy, decreased output of naïve T cells and the resulting memory-type oligoclonal T cell repertoire are of particular importance^{16-18,33}.

As individuals age, major immunological events such as T-cell activation and cytokine production are progressively altered. Interestingly, in all analyses performed, the elderly group presented a balanced profile between regulatory and proinflammatory cytokines, with a prominent contribution of innate immune cells to this balance. Healthy immunosenescence is a net result of the continuous adaptation of the body to the deteriorative changes occurring over time. According to this hypothesis, body resources are continuously optimized, and successful immunosenescence must be considered a very dynamic process of remodeling^{32,33}. Our results supports this hypothesis and they showed that immune compartments undergo remodeling changes during healthy aging to achieve a fine balance.

Taken together, our results suggest a distinct pattern of changes in cytokine production by different leukocyte subsets during aging. Furthermore, healthy aging in this Brazilian population may imply alternative mechanisms of immune responses to maintain an appropriate balance between regulatory and proinflammatory responses with well-preserved innate immunological activities compensating an impaired adaptive immune response at senescence.

Data presented in this study may help to propose immunological reference values to future studies in Brazilian individuals at all ages. Longitudinal studies may reveal in more detail the important role for innate immune cells among elderly. Due to the progressive increase in the aged population in Brazil, these studies are critical for design and implementation of more rational interventions to optimize immune function at advanced age, reducing the

incidence and severity of infectious disease and improving the quality of life for elder individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, FAPEMIG (APQ-03593-13). Some of the authors are recipients of research fellowships (A.T., A.M.C.F.,O.A.M.F.) and a PhD scholarship (G.N.S.) from Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil.

REFERENCES

- 1 - Cossarizza A, Ortolani C, Monti D, Franceschi C. Cytometric analysis of immunosenescence. *Cytometry*. 1997 Apr 1;27(4):297-313.
- 2 - Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. An evolutionary perspective in immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 908: 244-254.
- 3 - Fülöp T, Dupuis G, Witkowski JM, Larbi A. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Rev Invest Clin*. 2016 Mar-Apr; 68 (2): 84-91.
- 4 - Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Grassilli E, Troiano L, Salvioli S, Negro P, Capri M, Guido M, Azzi R, Sansoni P, Paganelli R, Fagiolo U, Baggio G, Donazzan S, Mariotti S, D'addato S, Gaddi A, Ortolani C, Cossarizza A. Immunosenescence in humans: deterioration or remodelling. *Intern. Rev. Immunol* 1995; 12, 57–74

- 5 - Gerli, R, Monti, D, Bistoni, O, Mazzone, AM, Peri, G, Cossarizza, A, Di Gioacchino, M, Cesarotti, ME, Doni, A, Mantovani, A, Franceschi, C, Paganelli, R. Chemokines, sTNF-Rs and sCD30 serum levels in healthy aged people and centenarians. *Mech. Ageing Dev* 2000; 20 (121(1–3)), 37–46.
- 6 - Franceschi C, Valensin S, Bonafe M, Paolisso G, Yashin AI, Monti D, De Benedictis G. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp Gerontol* 2000; 35: 879-896.
- 7 - Bruunsgaard, H, Andersen-Ranberg, K, Hjelmberg, JB, Pedersen, BK, Jeune, B. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am. J. Med* 2003; 11, 278–283.
- 8 - Alberti, S., Cevenini, E., Ostan, R., Capri, M., Salvioli, S., Bucci, L., Ginaldi, L., De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 2006; 127 (6): 560–566.
- 9 - Hobbs, MV, Weigle, WO, Noonan, DJ, Torbett, B, McEvelly, E, Koch, RJ, Cardenas, GJ, Ernst, DN. Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice. *J. Immunol* 1993; 150: 3602–3614.
- 10 - Albright, JW, Zuiga-Pflicker, JC, Albright, JF. Transcriptional control of IL-2 and IL-4 in T cells of young and old mice. *Cell Immunol* 1995; 164: 170–175.
- 11 - Shearer, GM. Th1/Th2 changes in aging. *Mech. Ageing Dev* 1997; 94: 1–5.
- 12 - Speziali, E, Bethony, J, Martins-Filho, O, Fraga, LAO, Lemos, DS, Souza, LJ, Correa-Oliveira, R, and Faria, AMC. Production of interferon- γ natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation* 2004; 13(5/6): 327-333.

- 13 - Franceschi C, Monti D, Barbieri D, Salvioli S, Grassilli E, Capri M, Troiano L, Guido M, Bonafè M, Tropea F, Salomoni P, Benatti F, Bellesia E, Macchioni S, Anderlini R, Sansoni P, Mariotti S, Wratten ML, Tetta C, Cossarizza A. Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11 Suppl 9:18-25.
- 14 - Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today* 2000 Oct; 21(10): 515-21.
- 15 - Pawelec, G. Hallmarks of human “immunosenescence”: adaptation or dysregulation? *Immun Ageing* 2012 Jul 25; 9 (1): 15.
- 16 - Akbar AN1, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol* 2005 Oct; 17 (5): 480-5.
- 17 - Malaguarnera L, Ferlito L, Imbesi RM, Gulizia GS, Di Mauro S, Maugeri D, Malaguarnera M, Messina A. Immunosenescence: a review. *Arch Gerontol Geriatr* 2001 Feb; 32 (1): 1-14.
- 18 - Pawelec G1, Solana R. Immunoageing - the cause or effect of morbidity. *Trends Immunol* 2001 Jul; 22 (7): 348-9.
- 19 - Solana R, Graham Pawelec and Raquel Tarazona. Aging and Innate Immunity. *Immunity* 2006 May; 24 (5): 491-4.
- 20 - Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T. Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans. *Semin Immunol*. 2012 Oct; 24 (5): 331-41.
- 21 - Pawelec G, Solana R, Remarque E, Mariani E. Impact of aging on innate immunity. *J Leukoc Biol* 1998; 64 :703-712.
- 22 - Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E, Fagiolo U, Passeri M, Franceschi C. Lymphocyte subsets and

natural killer cell activity in healthy old people and centenarians. *Blood* 1993; 80: 2767-2773.

23 - Solana R, Alonso MC, Pena J. Natural killer cells in healthy aging. *Exp Gerontol* 1999; 34: 435-443.

24 - Solana R, Mariani E. NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 2000; 18: 1613-1620.

25 - Lloberas J, Celada A. Effect of aging on macrophage function. *Exp Gerontol* 2002; 37: 1325-1331.

26 - Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol* 2002; 169: 4697-4701.

27 - Villanueva JL, Solana R, Alonso MC, Pena J. Changes in the expression of HLA-class II antigens on peripheral blood monocytes from aged humans. *Dis Markers* 1990; 8: 85-91.

28 - Herrero C, Marques L, Lloberas J, Celada A. IFN gamma-dependent transcription of MHC class II IA is impaired in macrophages from aged mice. *J Clin Invest* 2001; 107: 485-493.

29 - Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004; 3: 161-167.

30 - Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Aging Cell* 2004; 3: 217-226.

31 - Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Apr; 23: 64-74

- 32 - De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* 2005 Apr 11; 579 (10): 2035-9.
- 33 - 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. Update. *Front Biosci* 2002 7: d1056–d1183.
- 34 - Faria AM, de Moraes SM, de Freitas LH, Speziali E, Soares TF, Figueiredo-Neves SP, Vitelli-Avelar DM, Martins MA, Barbosa KV, Soares EB, Sathler-Avelar R, Peruhype-Magalhães V, Cardoso GM, Comin F, Teixeira R, Elói-Santos SM, Queiroz DM, Corrêa-Oliveira R, Bauer ME, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho AO Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *Neuroimmunomodulation.* 2008; 15(4-6):365-79.
- 35 - Rajilić-Stojanović M., Heilig H G H J, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H and De Vos W M. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* Jul 2009; 11(7): 1736–1751.
- 36 - Biagi E, Nylund L, Candela M, Ostan R, Bucci L, Pini E, Nikkila J, Monti D, Satokari R, Franceschi C, Brigidi P, De Vos W. Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. *PLoS One* 2010; 5(5): e10667.
- 37 - Gardner EM, Murasko DM. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology* 2002; 3 (5): 271-90.
- 38 - Luiza-Silva M, Campi-Azevedo AC, Batista MA, Martins MA, Avelar RS, Da Silveira LD, Bastos Camacho LA, De Menezes MR, De Lourdes De Sousa Maia M, Guedes Farias RH, Da Silva FM, Galler R, Homma A, Leite Ribeiro JG, Campos Lemos JA, Auxiliadora-Martins M, Eloi-Santos SM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA.

Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. *J Infect Dis* 2011 Sep 15; 204 (6): 873-83.

39 - Hirsch EC, Breidert T, Rousselet E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Jun; 991: 214-28.

40 - Muñoz-Valle JF, Oregón-Romero E, Rangel-Villalobos H, Martínez-Bonilla GE, Castañeda-Saucedo E, Salgado-Goytia L, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguiar B, Alarcón-Romero L del C, Espinoza-Rojo M, Parra-Rojas I. High expression of TNF alpha is associated with -308 and -238 TNF alpha polymorphisms in knee osteoarthritis. *Clin Exp Med* 2014 Feb; 14 (1): 61-7.

41 - Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators Inflamm* 2014; 2014: 561459.

42 - Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *J Reprod Immunol* 2000 Jul; 47 (2): 87-103.

43 - Gomes-Santos AC, Moreira TG, Castro-Junior AB, Horta BC, Lemos L, Cruz DN, Guimarães MA, Cara DC, McCafferty DM, Faria AM. New insights into the immunological changes in IL-10-deficient mice during the course of spontaneous inflammation in the gut mucosa. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012:560817.

44 - Lissauer D, Eldershaw SA, Inman CF, Coomarasamy A, Moss PA, Kilby MD. Progesterone promotes maternal-fetal tolerance by reducing human maternal T-cell polyfunctionality and inducing a specific cytokine profile. *Eur J Immunol* 2015 Oct; 45 (10): 2858-72.

- 45 - Müller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun.* 2014 Jul; 39:8-22.
- 46 - Zanni F, Vescovini R, Biasini C, Fagnoni F, Zanlari L, Telera A, Di Pede P, Passeri G, Pedrazzoni M, Passeri M, Franceschi C, Sansoni P. Marked increase with age of type 1 cytokines within memory and effector/cytotoxic CD8⁺ T cells in humans: a contribution to understand the relationship between inflammation and immunosenescence. *Exp Gerontol* 2003 Sep; 38 (9): 981-7.
- 47 - Franceschi, C, Olivieri, F, Marchegiani, F, Cardelli, M, Cavallone, L, Capri, M, Salvioli, S, Valensin, S, De Benedictis, G, Di Iorio, A, Caruso, C, Prolisso, G, Monti, D. Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway and response to oxidative stress play a major role in the genetics of human longevity: the lesson of centenarians. *Mech Ageing Dev* 2005; 126 (2): 351–361.
- 48 - Testa R, Olivieri F, Bonfigli AR, Sirolla C, Boemi M, Marchegiani F, Marra M, Cenerelli S, Antonicelli R, Dolci A, Paolisso G, Franceschi C. Interleukin-6-174 G > C polymorphism affects the association between IL-6 plasma levels and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2006 Mar; 71 (3): 299-305.
- 49 - Collins, DP, Luebering, BJ, Shout, DM. T-lymphocytes functionality assessed by analysis of cytokine receptor expression, intracellular cytokine expression and femtomolar detection of cytokine secretion by quantitative flow cytometry. *Cytometry* 1998; 33 (2): 249–255.
- 50 - Jung, T, Schauer, U, Heusser, C, Neumann, C, Rieger, C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1993; 26, 197–207.
- 51 - Prussin, C. Cytokine flow cytometry understanding cytokine biology at the single cell level. *J. Clin Immunol* 1997; 17: 195–203.

- 52 - Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*. 1995 Dec 15;188(1):117-28.
- 53 - Rostaing L, Tkaczuk J, Durand M, Peres C, Durand D, de Préval C, Ohayon E, Abbal M. Kinetics of intracytoplasmic Th1 and Th2 cytokine production assessed by flow cytometry following in vitro activation of peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry* 1999 Apr 1; 35 (4): 318-28.
- 54 - Moreira ML, Dorneles EM, Soares RP, Magalhães CP, Costa-Pereira C, Lage AP, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Araújo MS. Cross-reactivity of commercially available anti-human monoclonal antibodies with canine cytokines: establishment of a reliable panel to detect the functional profile of peripheral blood lymphocytes by intracytoplasmic staining. *Acta Vet Scand* 2015 Sep 11; 57:51.
- 55 - Silveira AC, Santana MA, Ribeiro IG, Chaves DG, Martins-Filho OA. The IL-10 polarized cytokine pattern in innate and adaptive immunity cells contribute to the development of FVIII inhibitors. *BMC Hematol* 2015 Jan 16; 15(1): 1.
- 56 - Olsson J, Wikby A, Johansson B, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev* 2000 Dec 20; 121 (1-3): 187-201.
- 57 - Potestio M, Pawelec G, Di Lorenzo G, Candore G, D'Anna C, Gervasi F, Lio D, Tranchida G, Caruso C, Romano GC. Age-related changes in the expression of CD95 (APO1/FAS) on blood lymphocytes. *Exp Gerontol* 1999 Aug; 34 (5): 659-73.
- 58 - Duramad P, Tager IB, Holland NT. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol Lett* 2007 Jul 30; 172 (1-2): 48-59.

59 - Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999 Jan 16; 353 (9148): 196-200.

60 - Tulic MK, Hodder M, Forsberg A, McCarthy S, Richman T, D'Vaz N, van den Biggelaar AH, Thornton CA, Prescott SL. Differences in innate immune function between allergic and nonallergic children: new insights into immune ontogeny. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Feb; 127 (2): 470-478.

61 - Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, Sly PD, Holt PG. TH2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997 Nov; 27 (11): 1261-9.

Table 1: Global median of the universe of data of cytokine-producing leukocytes

Immune Compartment	Cytokine-producing leukocytes	Median
Innate	TNF+ Neutrophils	0.51
	IFN- γ + Neutrophils	0.34
	IL-4+ Neutrophils	0.43
	IL-10+ Neutrophils	0.19
	TNF- α + Monocytes	32.20
	IL-10+ Monocytes	3.00
	TNF- α + NK-cells	0.18
	IFN- γ + NK-cells	0.21
	IL-4+ NK-cells	0.19
Acquired	TNF- α + CD4 T-cells	0.28
	IFN- γ + CD4 T-cells	0.26
	IL-4+ CD4 T-cells	0.32
	IL-5+ CD4 T-cells	0.11
	IL-10+ CD4 T-cells	0.75
	TNF- α + CD8 T-cells	0.34
	IFN- γ + CD8 T-cells	0.28
	IL-4+ CD8 T-cells	0.27
	IL-5+ CD8 T-cells	0.14
	IL-10+ CD8 T-cells	0.40
	TNF- α + B-cells	0.41
	IL-4+ B-cells	0.30
	IL-10+ B-cells	0.57

FIGURES

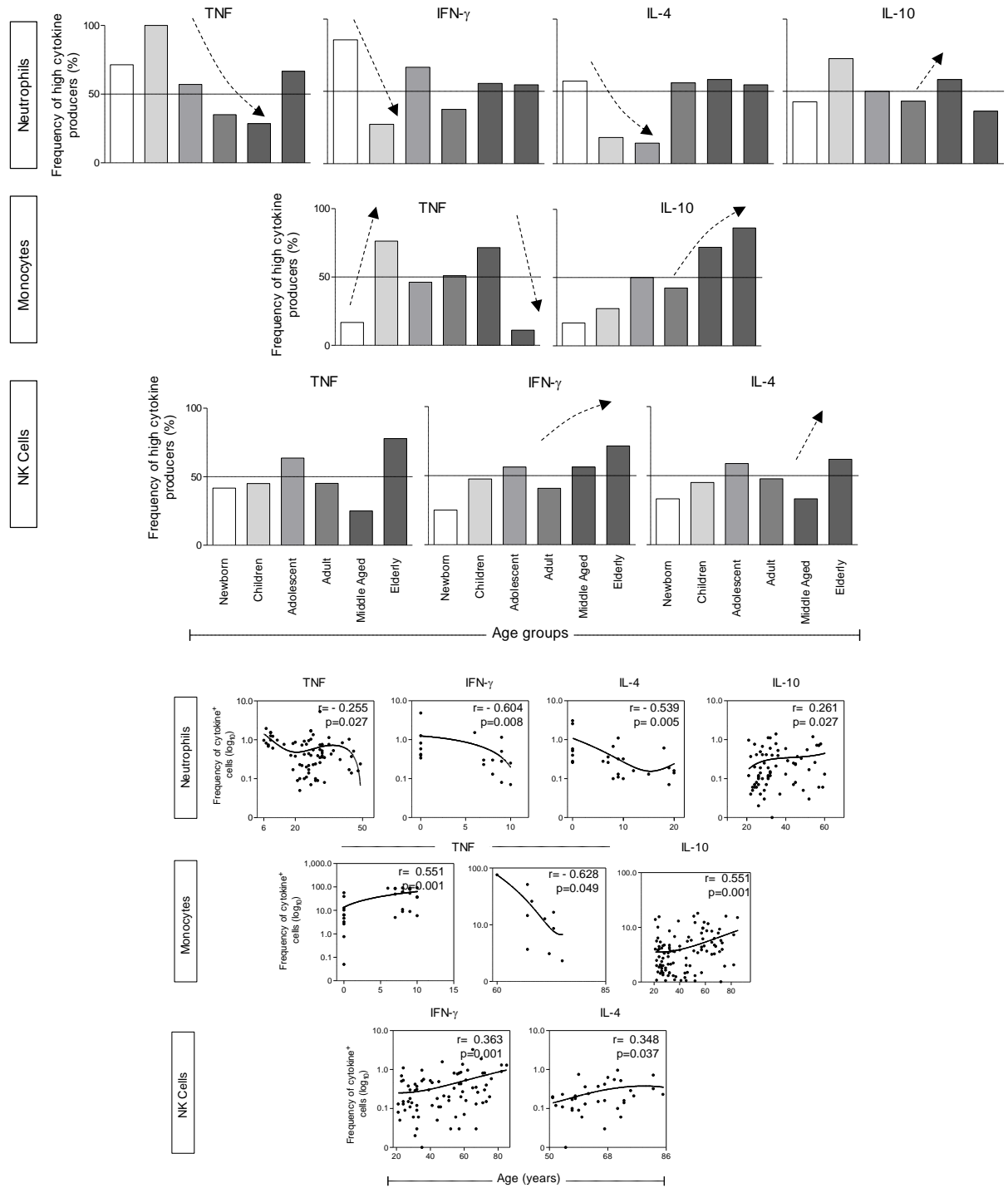


Figure 1: Overall profile of subjects with high frequency of Neutrophils, Monocytes and NK-cells producers of proinflammatory and regulatory cytokines. (A) The overall pattern of inflammatory and regulatory cytokines is presented as percentages of individuals with high frequency of cytokine-producing cells in each age group, as follow: Newborn – 0 years (n= 12); Children – 6 – 10 years (n=23); Adolescent – 11 – 20 years (n=22); Adults - 21-50 (n=80); Middle Aged – 51 - 60 (n=22); Elderly - 61-85 (n=22). The bars represents the percentage of subjects with high frequency of Neutrophils producers of Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-4 and IL-10, Monocytes producers of TNF- α and IL-10, and NK-cells producers of TNF- α , IFN- γ and IL-4. Relevant differences were considered when the percentage of individuals with high cell frequency producing a given cytokine emerged outside the 50th percentile (Continuous line). Spearman correlation was performed to evaluate increase or decrease in frequency of cytokine-producing cells among age groups. Significant positive or negative correlations were represented by dotted arrows (\uparrow). (B) Spearman's rank correlation. The corresponding Pearson's correlation coefficient (r) and the p value between cell-producing cytokine frequency and age in years is shown.

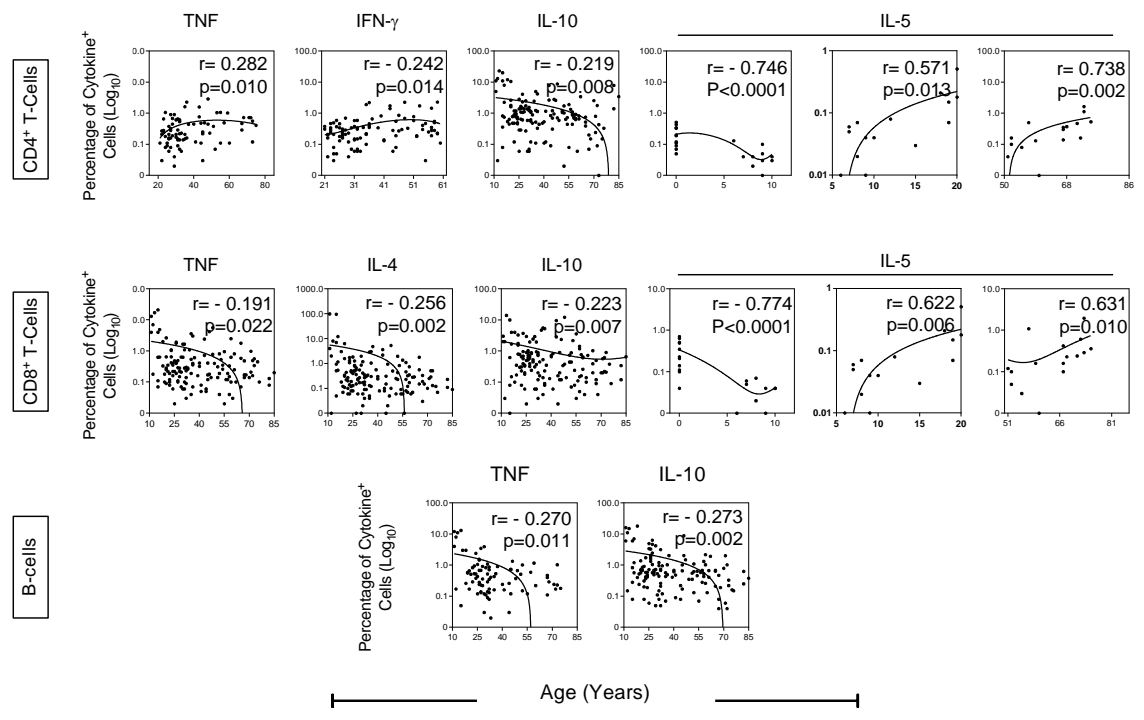
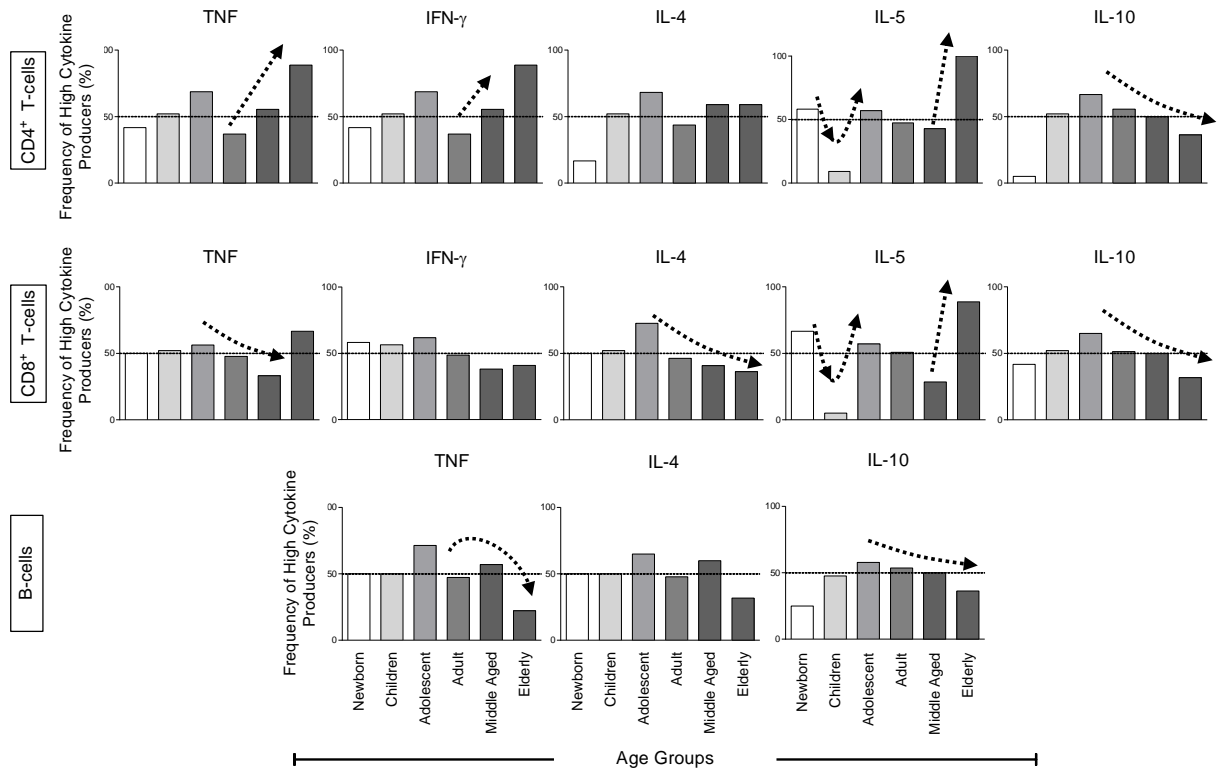
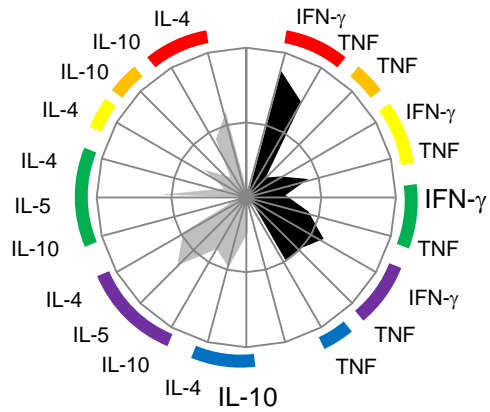


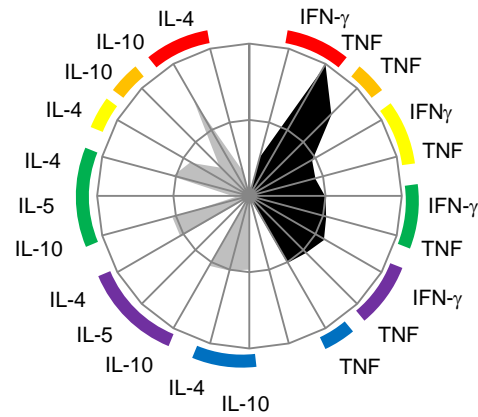
Figure 2: Overall profile of subjects with high frequency of CD4 T cells, CD8 T cells and B cells producers of proinflammatory and regulatory cytokines.

(A) The overall pattern of inflammatory and regulatory cytokines is presented as percentages of individuals with high frequency of cytokine-producing cells in each age group, as follow: Newborn – 0 years (n= 12); Children – 6 – 10 years (n=23); Adolescent – 11 – 20 years (n=22); Adults - 21-50 (n=80); Middle Aged – 51 - 60 (n=22); Elderly - 61-85 (n=22). The bars represents the percentage of subjects with high frequency of CD4 T cells producers of Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-10. CD8 T cells producers of TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10. B-cells producers of TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10. Relevant differences were considered when the percentage of individuals with high cell frequency producing a given cytokine emerged outside the 50th percentile (Continuous line). Spearman correlation was performed to evaluate increase or decrease in frequency of cytokine-producing cells among age groups. Significant positive or negative correlations were represented by dotted arrows (\uparrow). (B) Spearman's rank correlation. The corresponding Pearson's correlation coefficient (r) and the p value between cell-producing cytokine frequency and age in years is shown.

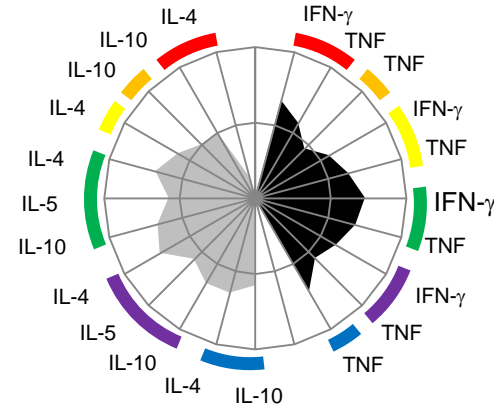
Newborn



Children

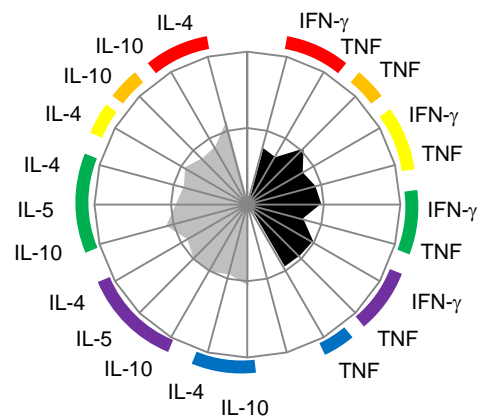


Adolescent

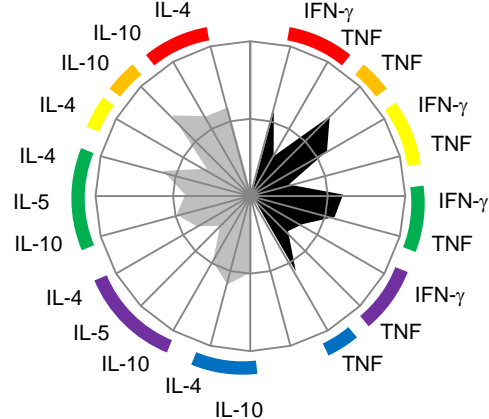


- Neutrophils
- Monocytes
- NK-cells
- CD4+T-cell
- CD8+T-cell
- B-cell

Adult



Middle Aged



Elderly

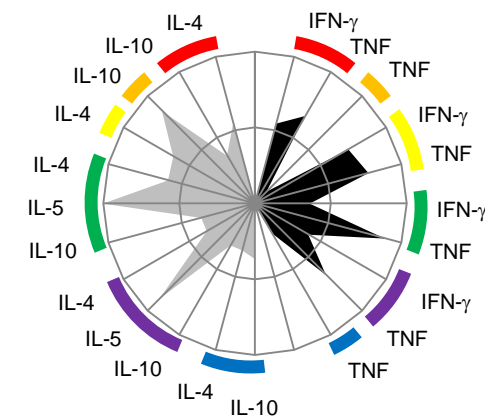


Figure 3: Radar graph representing the balance of subjects with high frequency of inflammatory (■) or regulatory (■) cytokine-producing cells of innate and adaptive immunity. Graphs were constructed with each axis displaying the proportion of subjects with high frequency of cytokine-producing cells within a given leukocyte subset. The values of each axis can be joined to form the central polygon area which represents the general inflammatory or regulatory cytokine balance. Increasing or decreasing central polygon areas reflect higher or lower contribution of inflammatory or regulatory cytokine balance in each age group. The analysis of the radar chart axes highlights the contribution of distinct leukocyte subset for the overall cytokine balance. The age groups were categorized as follow: Newborn – 0 years (n= 12); Children – 6 – 10 years (n=23); Adolescent – 11 – 20 years (n=22); Adults - 21-50 (n=80); Middle Aged – 51 - 60 (n=22); Elderly - 61-85 (n=22).

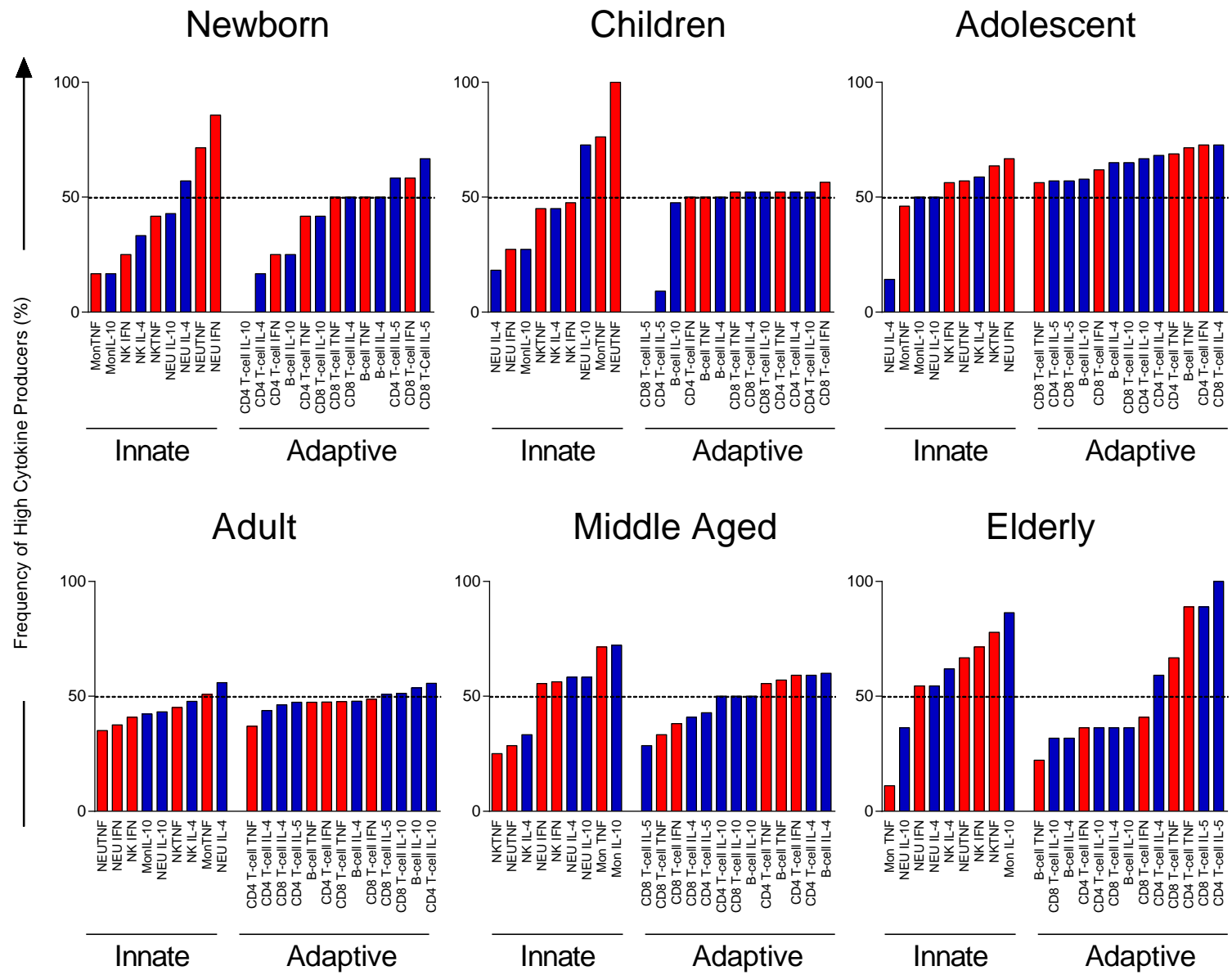


Figure 4. Overall signature of high cytokine producers in the innate and adaptive immune compartments in age groups, as follow: Newborn – 0 years (n= 12); Children – 6 – 10 years (n=23); Adolescent – 11 – 20 years (n=22); Adults - 21-50 (n=80); Middle Aged – 51 - 60 (n=22); Elderly - 61-85 (n=22). The ascendant frequency of high cytokine producers at the innate and adaptive immunity of each group was demonstrated by bar graphics. The red bars represent high inflammatory cytokine producing-cells and the blue bars represent high regulatory cytokine producing-cells. The dotted line represent the 50th percentile that was used as a cut-off to identify relevant increases.