

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

*ENVELHECIMENTO: MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO,
FAGOCITOSE E CITOCINAS ANTI E PRÓ-INFLAMATÓRIAS PELA
NORADRENALINA E ÁCIDO CAFÉICO EM GRANULÓCITOS HUMANOS.*

RAQUEL CUNHA LARA

Belo Horizonte – MG

Fevereiro / 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

*ENVELHECIMENTO: MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO,
FAGOCITOSE E CITOCINAS ANTI E PRÓ-INFLAMATÓRIAS PELA
NORADRENALINA E ÁCIDO CAFÉICO EM GRANULÓCITOS HUMANOS.*

RAQUEL CUNHA LARA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Míriam Chaves Schultz

Belo Horizonte – MG

Fevereiro / 2013

*Dedico esta dissertação aos amores da minha vida:
Mamãe, Papai, Rodrigo e André, por me apoiarem e
estarem por perto, SEMPRE!*

AGRADECIMENTOS

À DEUS por me permitir escolher entre os mais diversos caminhos e optar por aquele que me faz tão feliz!

À professora Miriam pelos ensinamentos, pela acolhida, pela paciência, pela presença, pela oportunidade conferida, por ser minha amiga! Pelo exemplo profissional e pessoal! Sou muito grata a você. Meu muito e sincero obrigado!

À minha mãe Regina pela proteção, pelo colo, pelos abraços, pelas palavras de conforto, por ser uma companheira incansável e inseparável, por ser tão doce, tão amável, tão profunda e verdadeira. Pelos nossos pequenos passeios, tão cheios de grandes e boas conversas, por te buscar na escola e seu rosto ser um conforto aos meus olhos, por ter a indescritível sorte de tê-la como mãe! Nada que eu disser, é suficiente para descrever minha gratidão e meu “agarramento” por você. Eu te amo!

Ao meu pai Renato pela confiança, pelo apoio, pela paciência. Porque você é o meu eterno herói! Meu Papou, meu pai peão, babisco, baldi... o nosso Tatato, que de um jeito totalmente singular é alguém indispensável e impossível de ser copiado. Te amo e obrigada por sempre estar comigo.

Ao Rodrigo por acreditar em meu potencial, por me incluir em seus planos de vida. Por sempre me impulsionar e dizer que eu preciso continuar. Por ser um irmão companheiro e amigo. E principalmente porque eu o amo muito!

Ao André por ser meu amor, por me incentivar sempre, por estar pronto para me ajudar em qualquer situação, por nunca ter me deixado sozinha desde que estamos juntos. Por me julgar inteligente e capaz. Você me faz sonhar, me dá alegria e renova minhas energias! Te amo nonou...

À tia Patrícia por ser uma fonte de inspiração! Pela amizade, amor e por ter nos dado o Rafa, motivo de tanta alegria e empolgação para minha vida!

À Andréa pela amizade sincera, por me fazer tão bem! Por ser tão querida, divertida, carinhosa e companheira. Por fazer os meus dias serem agradáveis. Pelos cafés, horas de conversas, FeSBE, risadas, abraços, enfim, por me ajudar em tudo que precisei. Amo você

Dedéia...rsrsrs

À Sandrinha, Bárbara e Flávia por serem tão queridas, amigas, companheiras. Obrigada pelos conselhos, pelas palavras necessárias, pela simples presença que deixou cada dia especial. Adoro muito todas vocês! Flávia muitas e muitas vezes, você fez com que eu me sentisse mais segura. Sua companhia é muito importante!

Ao Paulo e a Mari por serem tão agradáveis e serem uma companhia amiga e feliz. Sem vocês, o laboratório não seria o mesmo. Obrigada!

À Gláucia pelo apoio, pelos ensinamentos, pelos conselhos e alertas. Por ser uma mãezona no laboratório e me confortar em vários momentos. Obrigada minha amiga querida!

À Clara pelo tempo que dedicou a mim, por ter me ensinado tanto, tantas vezes. Por ser doce, educada, companheira, prestativa e amiga! Aprendi muito com seu jeito de ser e lidar com as coisas. Obrigada menina!

À Eliane pela presença e pelo carinho de sempre!

À todos que estiveram comigo e de alguma maneira contribuíram para minha formação. O meu muito obrigada!

“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (Marthin Luther King)

RESUMO

O envelhecimento é comumente definido como um acúmulo de diversas mudanças deletérias nas células e tecidos que ocorre ao longo dos anos, responsável por um aumento do risco de doenças e morte. O ácido caféico [3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-propanóico] é um ácido fenólico encontrado em vários produtos agrícolas, como café, feijão, batata, grãos e vegetais que possuem ações antioxidantes. Assim, o objetivo do nosso trabalho foi Avaliar o efeito modulador da Noradrenalina e do Ácido Caféico, sobre a produção de Óxido Nítrico, o processo de Fagocitose e a dosagem de citocinas anti e pró-inflamatórias, em granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento. Projeto de pesquisa CAAE 0663.0.203.000-11. Granulócitos (1×10^6) de doadores sadios entre 20-80 anos, de ambos os sexos, separados em três grupos: 1- 20 a 39 anos, 2- 40 a 60 anos e 3-60-80 anos, foram incubados à 37°C de quatro formas diferentes, a saber: [A] Granulócitos 1×10^6 [B] Granulócitos 1×10^6 + Noradrenalina 10^{-9} M [C] Granulócitos 1×10^6 + Ácido Caféico 500 uM [D] Granulócitos 1×10^6 + Noradrenalina 10^{-9} M +Ácido Caféico 500 uM. Estas concentrações foram determinadas através de curva dose-resposta. Para avaliar o poder antioxidante do ácido caféico foi usado o teste de Fagocitose e Avaliação da produção de Óxido Nítrico. Para avaliar a ação anti-inflamatória dosamos IL-4, IL-10 e IL-8 através do ensaio de Elisa "Sandwich". A análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann Whitney, e o teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey; sendo em ambos, $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo. Nossos resultados mostraram que existe uma redução ($p < 0,05$) da capacidade fagocítica de 32% (20-39 anos) para 20% (40-60 anos) e de 6% (60-80 anos) quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina. Quando avaliamos a produção de Óxido Nítrico (NO) verificamos que o ácido caféico é capaz de aumentar ($p < 0,05$) a produção de NO da Noradrenalina em 49% na faixa etária de 20-39 anos. Já quando avaliamos a faixa etária de 40-60 anos verificamos uma redução (34%); e de 60-80 anos uma redução (8%) da capacidade do ácido caféico realizar o seu efeito modulador sobre a noradrenalina. Ao avaliarmos se essa queda do efeito modulador do ácido caféico, sobre a noradrenalina, poderia estar relacionado aos mecanismos anti-inflamatórios celulares o nosso próximo passo foi dosar as interleucinas 4, 10 e 8. Nossos resultados mostraram que na faixa etária de 20-39 anos o ácido caféico foi capaz de reduzir ($p < 0,05$) a produção de IL-4 gerada pela noradrenalina em 22%. Entretanto, quando avaliamos o efeito do ácido caféico nas faixas etárias posteriores, verificamos uma redução desse efeito. 40-60 anos (17%) e 60-80 anos (3%). Quanto a IL-10 percebemos 16% de ativação de 20-39 anos, 18% de inibição (40-59 anos) e 16% de inibição (60-80 anos). Finalmente, em IL-8 temos 91% de diminuição de 20-39 anos, seguido por inibição de 54% e 16%, respectivamente entre 40-59 anos e 60-80 anos. Nossos resultados mostraram que o ácido caféico é capaz de modular o efeito da noradrenalina nos parâmetros analisados, a saber: fagocitose, produção de NO e IL-4, IL-10 e IL-8. Verificamos também que o processo de envelhecimento altera a ação do ácido caféico sobre os mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios e que estes podem estar relacionados com a diminuição do efeito da noradrenalina sobre o eixo HPA.

Palavras-chave: envelhecimento, noradrenalina, ácido caféico, sistema neuro-imune-endócrino, modulação, óxido nítrico, fagocitose, IL-4, IL-10, IL-8.

ABSTRACT

It is known today that many stimuli from the CNS are capable of modulating immune responses. The endocrine system and, in particular, one of the HPA axis is responsible for many links between these two systems. The caffeic acid is a phenolic acid found in many agricultural products, which have antioxidant actions. Thus, the aim of our study was to evaluate the modulating effect of Noradrenaline and caffeic acid, on the production of nitric oxide, the process of phagocytosis and cytokine anti and pro-inflammatory granulocytes in humans, during the aging process. Granulocytes (1×10^6) from healthy donors between 20-60 years, of both sexes, divided into three groups: 1 - 20-39 years 2 - 40 to 60 years, 3- 60 to 80 years, in four different ways, namely: [A] Granulocytes 1×10^6 [B] Granulocytes 1×10^6 Noradrenaline 10^{-9} M + [C] Granulocytes 1×10^6 caffeic acid 500 μ M + [D] + Granulocytes 1×10^6 Noradrenaline 10^{-9} M + caffeic acid 500 μ M. These acid concentrations were determined from concentration-response curve. To evaluate the modulating effect of caffeic acid and norepinephrine, phagocytosis and nitric oxide production tests were used. To assess modulation of anti-inflammatory action IL-4,IL-10 and IL-8 dosage by ELISA "sandwich" was carried. Statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney test and ANOVA followed by Tukey post-test; with $p < 0.05$ considered statistically significant. Our results showed that there is a reduction ($p < 0.05$) in phagocytic capacity of 32% (20 - 39 years) to 20% (40-60 years), and 6% (60-80 years) when caffeic acid (CA) is incubated with noradrenaline (NA). NO production assay verified that the AC is able to increase ($p < 0.05$) NO production of NA in 49% in the age group of 20-39 years. In the group aged between 40-60 years and 60-80 years, it was found a reduction (34%) and (8%), respectively; in the ability of the AC in its modulating effect on NA. In evaluating whether this drop in the modulating effect of AC on the NA could be related to anti-inflammatory cellular mechanisms our next step was to quantify IL-4,IL-10 and IL-8. In the age group of 20-39 years the AC was able to reduce ($p < 0.05$) IL-4 production generated by NA in 22%. However, when evaluating the effect of AC aged 40-60 years it was found a reduction of this effect (17%), and 60-80 years found reduction of 3%. As IL-10 perceive 16% activation of 20-39 year, 18% inhibition (40-59 years) and 16% inhibition (60-80 years). Finally, IL-8 have 91% decrease of 20-39 years, followed by inhibition of 54% and 16% respectively, between 40-59 years and 60-80 years. Our results showed that caffeic acid can modulate the effect of noradrenaline in the parameters analyzed, namely phagocytosis, production of NO, IL-4, IL-10 and IL-8. We also found that the aging process alters the action of caffeic acid on the mechanisms antioxidant and anti-inflammatory and these may be related to decreased effect of norepinephrine on the HPA axis.

Keywords: aging, noradrenaline, caffeic acid, neuro-immune-endocrine, modulation, nitric oxide, phagocytosis, IL-4, IL-10, IL-8

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

° C = medida de temperatura- graus celsius

1N = normal- medida de grandeza

AC = Ácido Caféico

Água MILLI-Q = água ultrapura

COEP = Comitê de ética

DMSO = dimetilsulfóxido

ERN = Espécies Reativas de Nitrogênio

ERO = Espécies Reativas de Oxigênio

G = granulócitos

HCl =ácido clorídrico

Heat shock proteins = Proteínas de choque térmico

HPA = Hipotálamo-pituitária-adrenal

IBGE = Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN- γ = interferon gama

IL -18 = interleucina 18

IL-1 = interleucina 1

IL-10 = interleucina 10

IL-11 = interleucina 11

IL-12 = interleucina 12

IL-13 = interleucina 13

IL-14 = interleucina 14

IL-1 β = interleucina 1 beta

IL-6 = interleucina 6

IL-8 = Interleucina 8

IRS/PI3-K/Akt/eNOS= Via indutiva de produção de Óxido Nítrico

KCl = cloreto de potássio

KH₂PO₄ = hidrogenofosfato de potássio

LPS = Lipossacarídeo

NA = Noradrenalina

Na₂HPO₄ = fosfato de sódio dibásico

NaCl = cloreto de sódio

NaNO₂ = nitrito de sódio

NaOH = Hidróxido de sódio

NF-K β = fator de transcrição nuclear kappa b

NK = Células natural killer

NO = Óxido Nítrico

NO mt = óxido nítrico sintetase mitocondrial

NOe = Óxido Nítrico sintetase endotelial

NOi = Óxido Nítrico sintetase indutiva

NO_n = Óxido Nítrico neuronal

NO_s = Óxido Nítrico Sintetase

OMS = Organização Mundial de Saúde

pH = potencial hidrogeniônico

PMN = Neutrófilos Polimorfonucleares

RNI = Nitrogênio Reativo Intermediário

ROI = Oxigênio Reativo Intermediário

SAM = Simpático Adreno medular

SI = Sistema Imune

SNA = Sistema Nervoso Autônomo

SNAS = Sistema Nervoso Autônomo Simpático

SNC = Sistema Nervoso Central

TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido

Th 3 = perfil inflamatório

Th1 = perfil inflamatório

Th17 = perfil inflamatório

Th2 = perfil inflamatório

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TREGS = células T regulatórias

UFMG = Universidade Federal de Minas Gerais

UV = Radiação Ultravioleta

Zc3b = zimozan opsonizado

$\alpha 1$ = receptor adrenérgico alfa 1

$\alpha 2$ = receptor adrenérgico alfa 2

$\beta 1$ = receptor adrenérgico beta 1

$\beta 2$ = receptor adrenérgico beta 2

$\beta 3$ = receptor adrenérgico beta 3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1960 e (B) uma projeção para 2050.

Figura 2: Esquema ilustrativo das interações entre os sistemas nervoso, imune e endócrino.

Figura 3: Fórmula estrutural do Ácido Caféico

Figura 4: Comparação da produção de óxido nítrico por granulócitos humanos estimulados com Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 5: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico por granulócitos na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 6: Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 7: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção da IL-4 por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 8: Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 9: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção de IL-10 por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 10: Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 11: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção de IL-8 por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.

Figura 12: Comparação da produção de óxido nítrico por granulócitos humanos estimulados com Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 13: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 14: Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 15: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de expressão de IL-4 por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 16: Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 17: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na produção de IL-10 por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 18: Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 19: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na produção de IL-8 por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.

Figura 20: Comparação da produção de óxido nítrico por Granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 21: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico por Granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 22: Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 23: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na produção de IL-4 por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 24: Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e Noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 25: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na de produção de IL-10 por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 26: Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e Noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 27: Avaliação da modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na produção de IL-8 por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

Figura 28: Avaliação comparativa do efeito modulador do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina na capacidade fagocítica dos granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

Figura 29: Avaliação comparativa do efeito modulador do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina sobre a produção de óxido nítrico por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

Figura 30: Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a Noradrenalina sobre a produção de interleucina 4 (IL-4) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

Figura 31: Avaliação comparativa do efeito modulador do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina sobre a produção de interleucina 10 (IL-10) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

Figura 32: Avaliação comparativa do efeito modulador do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina sobre a produção de interleucina 8 (IL-8) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de doadores de acordo com as faixas etárias e protocolos.

Tabela 2: Ensaio de Fagocitose – Disposição dos Granulócitos.

Tabela 3: Produção de Óxido Nítrico – disposição dos Granulócitos.

Tabela 4: Leitura da Produção de Óxido Nítrico – Leitor de ELISA 540nm.

Tabela 5: Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Tabela 6: Avaliação da Modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de Fagocitose em granulócitos humanos na faixa etária de 20 a 39 anos.

Tabela 7: Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Tabela 8: Avaliação da Modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de Fagocitose em granulócitos humanos na faixa etária de 40 a 59 anos.

Tabela 9: – Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.

Tabela 10: Avaliação da Modulação do Ácido Caféico sobre a Noradrenalina no processo de Fagocitose em Granulócitos humanos na faixa etária de 60 a 80 anos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Envelhecimento	19
1.2	Neuroimunomodulação	22
1.3	Noradrenalina	25
1.4	Granulócitos	26
1.5	Mecanismos anti-oxidantes	27
1.5.1	Ácido Caféico	28
1.6	Mecanismos Neuroprotetores (Óxido Nítrico)	29
1.7	Mecanismos anti e pró-inflamatórios	30
1.7.1	Citocinas	30
1.7.2	Interleucina 4 (IL-4)	32
1.7.3	Interleucina 10 (IL-10)	32
1.7.4	Interleucina 8 (IL-8)	33
2.0	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Comitê de ética	36
3.2	Material e Equipamentos	36
3.2.1	Equipamentos	36
3.2.2	Materiais	36
3.3	Reagentes	37
3.4	Soluções	38
3.4.1	Solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS)	38
3.4.2	Solução de Azul de Trypan	39
3.4.3	Meio de cultura RPMI	39
3.4.4	Solução de Ácido Caféico à 2774 Mm	39
3.4.5	Solução de Noradrenalina $170 \times 10^{-4} M$	40
3.4.6	Solução Padrão de Nitrito	40
3.4.7	Gradiente de separação de células	40
3.4.8	Solução de Sufanilamida 1%	40
3.4.9	Solução de Naftilenodiamida 0,1%	41

3.4.10 Solução de Griess -----	41
3.5 Definição da concentração usada para a Noradrenalina -----	41
3.6 Definição da concentração usada para o Ácido Caféico-----	41
3.7 Métodos-----	42
3.7.1 Seleção de Doadores-----	42
3.7.2 Questionário de Perguntas para seleção de doadores-----	43
3.8 Coleta de Sangue -----	43
3.9 Procedimento para obtenção do ZC3b corado-----	44
3.10 Fagocitose através de Microscopia Óptica -----	45
3.11 Produção de Óxido Nítrico pela reação de Griess -----	46
3.12 Quantificação da produção de citocinas -----	48
3.13 Viabilidade celular -----	49
3.14 análise estatística -----	49
4 RESULTADOS-----	50
4.1. Avaliação do processo de Fagocitose por Microscopia Óptica, geração de óxido nítrico e produção de interleucinas pro e antiinflamatórias por granulócitos humanos.-----	50
4.1.1 Faixa etária de 20 a 39 anos-----	50
4.1.2 Faixa etária de 40 a 59 anos-----	61
4.1.3 Faixa etária de 60 a 80 anos-----	71
4.2 Avaliação comparativa do processo de Fagocitose por Microscopia Óptica, geração de óxido nítrico e produção de interleucinas pro e antiinflamatórios por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento. -----	81
5 DISCUSSÃO-----	86
5.1 Faixa etária de 20- 39 anos -----	86
5.2 Faixa etária 40-59 anos -----	95
5.3 Faixa etária 60-80 anos -----	97
6 CONCLUSÃO -----	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	103

