

REGOLAZIONE DELL'INFLAMMAGING

Gaetano Cipriani, Maurizio Ceccarelli

L'invecchiamento rappresenta il declino della funzione e dell'integrità di cellule, tessuti e organi, questo porta ad un aumento del rischio di malattie, disabilità e infine a morte. Le cause dell'invecchiamento sono numerose e, sul piano eziopatogenetico, sono riferite ai processi di glicosilazione, infiammazione, alterazione circolatoria e liberazione di radicali liberi dell'ossigeno. In realtà il danno cellulare finale è sempre mediato dalla liberazione dei radicali liberi dell'ossigeno.

Il danno da **glicosilazione** è determinato dall'aggiunta di zuccheri alle proteine con conseguente alterazione della loro funzione. In particolare, si ha la formazione iniziale delle Basi di Schiff, cui segue la formazione dei Prodotti di Amadori e, infine, dei Prodotti di Glicazione Avanzata, detti AGE. Gli AGE, a livello cellulare, inducono l'attivazione del Fattore Nucleare KB che, a sua volta, determina la trascrizione dei geni per le citochine. In particolare il Tumor Necrosis Factor α e l'Interleuchina 6, causando infiammazione. Inoltre, l'attivazione della NADPH Ossidasi aumenta lo stress ossidativo cellulare con liberazione di radicali liberi.

I **processi infiammatori**, definiti con il termine Inflammaging, danneggiano tutte le strutture biologiche. Il danno infiammatorio, che approfondiremo in seguito, induce l'attivazione dei Macrofagi M1 con liberazione di citochine infiammatorie ad azione chemiotattica per i leucociti. I leucociti attivati liberano ROS inducendo danno tissutale. Il macrofago attivato in fase M1 produce, inoltre, tirosina idrossilasi con produzione di norepinefrina. L'azione delle catecolamine sul microcircolo induce vasocostrizione con alterazione circolatoria.

L'**alterazione microcircolatoria** con riduzione della perfusione ematica ai tessuti induce ipossia acuta iniziale. A questa segue la riossigenazione con aumento dei radicali liberi dell'ossigeno.

Tutti questi aumenti di ROS si possono sommare quelli derivanti dall'**irregolare metabolismo ossidativo** delle deidrogenasi ridotte, nei mitocondri. Nella catena del trasporto degli elettroni si formano normalmente radicali liberi dell'ossigeno che possono sfuggire alla loro normale finalità (formazione di molecole di acqua) diffondendo e inducendo danno.

I ROS determinano danno cellulare a vari livelli:

- Danno del DNA mitocondriale
- Danno dei telomeri cromosomici
- Danno lipoperossidativo delle membrane biologiche
- Induzione dell'apoptosi cellulare

Approfondiamo il danno biologico conseguente all'**Inflammaging**.

Fisiologicamente i processi pro-infiammatori sono regolati da processi anti-infiammatori. Questo per evitare eccessivo danno biologico conseguente alla reazione infiammatoria. Con l'avanzare dell'età il sistema immune subisce un graduale deterioramento definito con il termine d'Immunosenescenza.

Nell'Immunosenescenza:

- Diminuisce il numero di mastcells
- Diminuisce la citotossicità dei NK
- Diminuisce la chemiotassi e la funzione dei neutrofili
- Aumentano i Linfociti CD 8 e diminuiscono i CD 4
- Diminuiscono le plasmacellule
- Diminuisce la fagocitosi macrofagica con aumento della liberazione di citochine infiammatorie.

Ne consegue, inoltre, una caduta dell'immunità innata per riduzione, a livello macrofagico, dei Toll-Like Receptors. I TLR riconoscono molecole espresse comunemente dai batteri o dai virus come il lipopolisaccaride. Dopo il legame con la rispettiva molecola del microbo attivano dei fattori trascrizionali che copiano i geni che codificano le citochine infiammatorie. Tutto questo determina uno spostamento della bilancia di regolazione dell'Inflammaging a favore delle risposte pro-

infiammatorie. Questa situazione viene, poi, aggravata dalla diminuzione del DHEA (ormone a funzione antinfiammatoria) caratteristica dell'invecchiamento.

Nello stato d'immunosenescenza precedentemente descritto, l'istaurarsi di risposte immunitarie (innate o adattive) verso patogeni stanziali nel nostro corpo (come il Citomegalovirus e l'Herpes virus) inducono una risposta infiammatoria cronica e il conseguente inflammaging. Attore principale in questa risposta è il macrofago. Questo deriva dai monociti circolanti che, richiamati dallo stimolo chemiotattico dell'interferone gamma nella zona infettata, si differenziano nella forma M1 e liberano citochine infiammatorie.

In particolare, i linfociti NK (immunità innata) aggrediscono la cellula infettata dal virus e liberano interferone gamma. Questo, a sua volta, induce il richiamo dei monociti e la formazione dei macrofagi M1. Possiamo, infatti, distinguere due differenti tipi di macrofagi. Quelli pro infiammatori, detti M1, che una volta attivati sintetizzano citochine infiammatorie (IL1 e TNF), enzimi lisosomiali e ROS. E quelli antinfiammatori, detti M2, che liberano citochine regolatrici della risposta infiammatoria (IL10) e stimolano il processo riparativo (collagenogenesi). E', da tutto ciò, chiara la necessità di bloccare, nell'inflammaging, l'attività del macrofago M1 e trasformarlo in macrofago M2.

Nel macrofago M1 attivato si hanno dei processi intracellulari che portano alla fosforilazione della mitogen-activated protein kinase p38 e alla lettura dei geni che sintetizzano le citochine infiammatorie. Gli antinfiammatori si inseriscono in alcuni punti di questo processo che può essere ugualmente, e più fisiologicamente, bloccato agendo sulla espressività genetica. La letteratura ci dice che possiamo inibire la risposta infiammatoria mediante la metilazione del DNA dei macrofagi con l'uso della S-adenosilmetionina.

Per comprendere questo meccanismo d'azione dobbiamo approfondire i concetti dell'epigenetica (scienza che studia le variazioni dell'espressione genica senza alterazione del DNA). L'espressione del DNA è regolata mediante i processi di metilazione, le modificazioni degli istoni e l'interferenza dell'RNA. Il processo di metilazione del DNA a livello della posizione 5 della citosina determina una regolazione dell'espressione genica, con variazioni della risposta fenotipica che possono essere anche ereditate.

In particolare è il processo di metilazione a livello del dinucleotide Citosina-Guanina, presente spesso a livello delle regioni promoter del DNA, che induce attenuazione dell'espressione genica (silenzamento del gene).

Sappiamo che la trascrizione di un gene strutturale (sintesi di RNA messaggero) richiede particolari processi di attivazione (proteine regolatrici) che consentono l'attacco dell'RNA polimerasi e la lettura del DNA con sintesi dell'RNA messaggero. La RNA polimerasi, per iniziare la lettura del gene strutturale, riconosce delle particolari sequenze nucleotidiche del promoter (dette di consenso). La metilazione dei nucleotidi di consenso determina blocco della lettura del gene e della sintesi delle proteine da questo codificate.

Il processo di silenziamento genico attraverso la SAM utilizza una DNA metiltransferasi che cede il gruppo metile della SAM alla cisteina. Il processo è reversibile e la citosina metilata può essere riattivata mediante un'ossidazione iniziale e una successiva deaminazione. Attraverso il processo di metilazione e di demetilazione possiamo regolare l'espressività genica mediante la silenziamento o l'attivazione del gene.

Il gruppo metile (CH₃) della SAM è chimicamente reattivo e le reazioni di transmetilazione sono presenti in più di 40 reazioni metaboliche. La SAM è anche coinvolta nella biosintesi di neurotrasmettitori collegati all'umore (come la dopamina e la serotonina).

Esiste un ciclo della SAM. Le metilasi utilizzano una molecola di SAM come substrato e producono S-adenosil-omocisteina. Questa viene idrolizzata ad omocisteina ed adenosina dalla adenosilomocisteinasi. La omocisteina viene successivamente riciclata a metionina attraverso il trasferimento di un metile da una molecola di 5-metiltetraidrofolato. La metionina può essere poi convertita successivamente a SAM dalla metionina adenosiltransferasi, completando il ciclo.

Da ciò, l'utilizzazione di SAM consente la metilazione della citosina a livello del DNA del macrofago M1 e porta alla risoluzione dell'infiammazione. La metilazione porta al silenziamento dei geni che sintetizzano le citochine infiammatorie con riduzione dell'inflammaging. Otteniamo così lo spostamento dell'equilibrio tra pro-inflammaging e anti-inflammaging a favore di quest'ultimo.

Sul piano pratico effettuiamo il trattamento dello stato clinico che consegue alla caduta della risposta immune per immunosenescenza e all'esaltazione dell'inflammaging con attivazione dei macrofagi e liberazione di interleuchina 6 e TNF. L'interleuchina 6,

liberata, svolge numerose funzioni a livello di diversi tessuti e, in particolare, a livello epatico determina la sintesi della Proteina C Reattiva (PCR) una delle principali proteine indice di infiammazione. Valutiamo, perciò, la PCR nel sangue del paziente quale principale marker dell'inflammaging e indice proditorio del rischio del paziente verso le patologie che conseguono all'inflammaging.

Oltre alla valutazione delle proteine infiammatorie, risposta oggettiva dell'inflammaging, valutiamo anche la predisposizione genetica mediante lo studio dei polimorfismi responsabili dell'esaltazione del processo infiammatorio.

Effettuata la valutazione, passiamo poi al trattamento, sia sistemico che locale. La letteratura ci dice che 500 micromoli di SAM diminuiscono la secrezione di TNF e Interleuchina 6, controllando l'infiammazione. Da ciò, calcoliamo, conoscendo il peso molecolare della SAM, la concentrazione percentuale della soluzione da utilizzare e utilizziamo soluzioni con 2 mg% di S-adenosil metionina..

BIBLIOGRAFIA

1. Ansar W, Ghosh S. C-reactive protein and the biology of disease. *Immunol Res.* 2013;2(1):131-142.
2. Arlt W, Hammer F, Sanning P, Butcher SK, Lord JM, Allolio B, Annane D, Stewart PM. Dissociation of serum dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in septic shock. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;2(7):2548-2554.
3. Aviv A, Valdes A, Gardner JP, Swaminathan R, Kimura M, Spector TD. Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;2(2):635-640.
4. Balistreri CR, Candore G, Accardi G, Bova M, Buffa S, Bulati M, Forte GI, Listì F, Martorana A, Palmeri M, Pellicanò M, Vaccarino L, Scola L, Lio D, Colonna-Romano G. Genetics of longevity. Data from the studies on Sicilian centenarians. *Immun Ageing.* 2012;2(1):8. Doi
5. Bartlett DB, Firth CM, Phillips AC, Moss P, Baylis D, Syddall H, Sayer AA, Cooper C, Lord JM. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (Inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. *Aging Cell.* 2012;2(5):912-915.
6. Baylis D, Bartlett DB, Syddall HE, Ntani G, Gale CR, Cooper C, Lord JM, Sayer AA. Immune-endocrine biomarkers as predictors of frailty and mortality: a 10-year longitudinal study in community-dwelling older people. *Age (Dordr)* 2012.
7. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002;2(7):3536-3542.
8. Beyer I, Mets T, Bautmans I. Chronic low-grade inflammation and age-related sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2012;2(1):12-22.

9. 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;2(4):278-283.
10. Buckley DI, Fu R, Freeman M, Rogers K, Helfand M. C-reactive protein as a risk factor for coronary heart disease: a systematic review and meta-analyses for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009;2(7):483-495.
11. Butcher SK, Killampalli V, Lascelles D, Wang K, Alpar EK, Lord JM. Raised cortisol:DHEAS ratios in the elderly after injury: potential impact upon neutrophil function and immunity. *Aging Cell.* 2005;2(6):319-324.
12. Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics.* 2011;2(11):2313-2323
13. Cesari M, Penninx BW, Pahor M, Lauretani F, Corsi AM, Rhys Williams G, Guralnik JM, Ferrucci. Inflammatory markers and physical performance in older persons: the InCHIANTI study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;2(3):242-248.
14. Chang DM, Lan JL, Lin HY, Luo SF. Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2002;2(11):2924-2927.
15. Christensen H, Boysen G, Johannesen HH. Serum-cortisol reflects severity and mortality in acute stroke. *J Neurol Sci.* 2004;2(2):175-180.
16. De Heredia FP, Sonia G-M, Ascension M. Chronic and degenerative diseases: obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 2012;2:332-338.
17. 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;2(10):2035-2039.
18. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflammation markers predicting frailty and mortality in the elderly. *Exp Mol Pathol.* 2006;2(3):219-227.
19. Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev.* 2005;2:147-157.
20. Fagiolo U, Cossarizza A, Scala E, Fanales-Belasio E, Ortolani C, Cozzi E, Monti D, Franceschi C, Paganelli R. Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. *Eur J Immunol.* 1993;2(9):2375-2378.
21. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De LM, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci.* 2000;2:244-254.
22. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007;2(1):92-105.
23. Gao HM, Hong JS. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 2008;2(8):357-365.
24. Giunta B, Fernandez F, Nikolic WV, Obregon D, Rrapo E, Town T, Tan J. Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2008;2:51.
25. Güder G, Bauersachs J, Frantz S, Weismann D, Allolio B, Ertl G, Angermann CE, Störk S. Complementary and incremental mortality risk prediction by cortisol and aldosterone in chronic heart failure. *Circulation.* 2007;2(13):1754-1761

26. Houben JM, Moonen HJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med*. 2008;2(3):235-246.
27. Labrie F. DHEA, important source of sex steroids in men and even more in women. *Prog Brain Res*. 2010;2:97-148.
28. Lencel P, Magne D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses*. 2011;2(3):317-321.
29. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;2(9):2045-2051.
30. Lio D, Candore G, Crivello A, Scola L, Colonna-Romano G, Cavallone L, Hoffmann E, Caruso M, Licastro F, Caldarera CM, Branzi A, Franceschi C, Caruso C. Opposite effects of interleukin 10 common gene polymorphisms in cardiovascular diseases and in successful ageing: genetic background of male centenarians is protective against coronary heart disease. *J Med Genet*. 2004;2(10):790-794.
31. Mazat L, Lafont S, Berr C, Debuire B, Tessier JF, Dartigues JF, Baulieu EE. Prospective measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in a cohort of elderly subjects: relationship to gender, subjective health, smoking habits, and 10-year mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;2(14):8145-8150.
32. O'Donovan A, Pantell MS, Puterman E, Dhabhar FS, Blackburn EH, Yaffe K, Cawthon RM, Opresko PL, Hsueh WC, Satterfield S, Newman AB, Ayonayon HN, Rubin SM, Harris TB, Epel ES. Health Aging and Body Composition Study. Cumulative inflammatory load is associated with short leukocyte telomere length in the Health, Aging and Body Composition Study. *PloS One*. 2011;2(5):e19687.
33. Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. *Ageing Res Rev*. 2012;2(1):237-252.
34. Pawelec G. Hallmarks of human "immunosenescence": adaptation or dysregulation? *Immun Ageing*. 2012;2(1):15.
35. Pawelec G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? *Mech Ageing Dev*. 1999;2(1):1-7.
36. Payette H, Roubenoff R, Jacques PF, Dinarello CA, Wilson PW, Abad LW, Harris T. Insulin-like growth factor-1 and interleukin 6 predict sarcopenia in very old community-living men and women: the Framingham heart study. *J Am Geriatr Soc*. 2003;2(9):1237-1243.
37. Petri MA, Mease PJ, Merrill JT, Lahita RG, Iannini MJ, Yocum DE, Ginzler EM, Katz RS, Gluck OS, Genovese MC, Van Vollenhoven R, Kalunian KC, Manzi S, Greenwald MW, Buyon JP, Olsen NJ, Schiff MH, Kavanaugh AF, Caldwell JR, Ramsey-Goldman R, St Clair EW, Goldman AL, Egan RM, Polisson RP, Moder KG, Rothfield NF, Spencer RT, Hobbs K, Fessler BJ, Calabrese LH. Effects of prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;2(9):2858-2868
38. Phillips AC, Carroll D, Gale CR, Lord JM, Arlt W, Batty GD. Cortisol, DHEA sulphate, their ratio, and all-cause and cause-specific mortality in the Vietnam Experience Study. *Eur J Endocrinol*. 2010;2(2):285-292.
39. Phillips AC, Carroll D, Gale CR, Lord JM, Arlt W, Batty GD. Cortisol, DHEAS, their ratio and the metabolic syndrome: evidence from the Vietnam experience study. *Eur J Endocrinol*. 2010;2(5):919-923.
40. Rea IM, Ross OA, Armstrong M, McNerlan S, Alexander DH, Curran MD, Middleton D. Interleukin-6-gene C/G 174 polymorphism in nonagenarian and octogenarian subjects in

the BELFAST study. Reciprocal effects on IL-6, soluble IL-6 receptor and for IL-10 in serum and monocyte supernatants. *Mech Ageing Dev.* 2003;2(4):555-561.

41. Rohleder N, Kudielka BM, Hellhammer DH, Wolf JM, Kirschbaum C. Age and sex steroid-related changes in glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. *J Neuroimmunol.* 2002;2(1-2):69-77.
42. Rosenfeld RS, Rosenberg BJ, Fukushima DK, Hellman L. 24-hour secretory pattern of dehydroisoandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1975;2(5):850-855.
43. Rudin E, Barzilai N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. *Immun Ageing.* 2005;2(1):1.
44. Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol.* 1999;2(8):959-970.
45. Saini A, Faulkner S, Al-Shanti N, Stewart C. Powerful signals for weak muscles. *Ageing Res Rev.* 2009;2(4):251-267.
46. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)* 2012;2(3):166-175.
47. Sam S, Corbridge TC, Mokhlesi B, Comellas AP, Molitch ME. Cortisol levels and mortality in severe sepsis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;2(1):29-35.
48. Sawalha AH, Kovats S. Dehydroepiandrosterone in systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2008;2(4):286-291.
49. Schaap LA, Pluijm SM, Deeg DJ, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tylavsky FA, Visser M. Health ABC Study. Higher inflammatory marker levels in older persons: associations with 5-year change in muscle mass and muscle strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2009;2(11):1183-1189.
50. Sergio G. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. *Inflamm Res.* 2008;2(12):558-563.
51. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 2010;2(4):507-513.
52. Shiels PG S, McGlynn LM, MacIntyre A, Johnson PC, Batty GD, Burns H, Cavanagh J, Deans KA, Ford I, McConnachie A, McGinty A, McLean JS, Millar K, Sattar N, Tannahill C, Velupillai YN, Packard CJ. Accelerated telomere attrition is associated with relative household income, diet and inflammation in the pSoBid cohort. *PloS One.* 2011;2(7):e22521.
53. Stolla M, Pelisek J, von Brühl ML, Schäfer A, Barocke V, Heider P, Lorenz M, Tirniceriu A, Steinhart A, Bauersachs J, Bray PF, Massberg S, Schulz C. Fractalkine is expressed in early and advanced atherosclerotic lesions and supports monocyte recruitment via CX3CR1. *PloS One.* 2012;2(8):e43572.
54. Straub RH, Cutolo M, Zietz B, Scholmerich J. The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. *Mech Ageing Dev.* 2001;2(14):1591-1611.
55. Straub RH, Lehle K, Herfarth H, Weber M, Falk W, Preuner J, Scholmerich J. Dehydroepiandrosterone in relation to other adrenal hormones during an acute inflammatory stressful disease state compared with chronic inflammatory disease: role of interleukin-6 and tumour necrosis factor. *Eur J Endocrinol.* 2002;2(3):365-374.

56. Straub RH, Miller LE, Scholmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *J Neuroimmunol.* 2000;2(1):10-15.
57. Targonski PV, Jacobson RM, Poland GA. Immunosenescence: role and measurement in influenza vaccine response among the elderly. *Vaccine.* 2007;2(16):3066-3069.
58. Trayhurn P, Drevon CA, Eckel J. Secreted proteins from adipose tissue and skeletal muscle - adipokines, myokines and adipose/muscle cross-talk. *Arch Physiol Biochem.* 2011;2(2):47-56.
59. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004;2(3):347-355.
60. Trivedi DP, Khaw KT. Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;2(9):4171-4177.
61. Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999;2(1):1-71.
62. Valenti G, Denti L, Maggio M, Ceda G, Volpato S, Bandinelli S, Ceresini G, Cappola A, Guralnik JM, Ferrucci L. Effect of DHEAS on skeletal muscle over the life span: the In Chianti Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004;2(5):466-472.
63. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Listi F, Nuzzo D, Lio D, Caruso C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 2007;2(1):83-91.
64. Vescovini R, Biasini C, Fagnoni FF, Telera AR, Zanlari L, Pedrazzoni M, Bucci L, Monti D, Medici MC, Chezzi C, Franceschi C, Sansoni P. Massive load of functional effector CD4+ and CD8+ T cells against cytomegalovirus in very old subjects. *J Immunol.* 2007;2(6):4283-4291.
65. Waters DL, Qualls CR, Dorin RI, Veldhuis JD, Baumgartner RN. Altered growth hormone, cortisol, and leptin secretion in healthy elderly persons with sarcopenia and mixed body composition phenotypes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2008;2(5):536-541.
66. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int.* 2009;2(11):1041-1050.
67. Wikby A, Nilsson BO, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Ernerudh J, Pawelec G, Ferguson F, Johansson B. The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech Ageing Dev.* 2006;2(8):695-704.
68. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;2(16):e74-e80.