

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Remodelamento de biomarcadores imunológicos séricos no processo de
envelhecimento

Joaquim Pedro Brito de Sousa

Uberlândia

2022

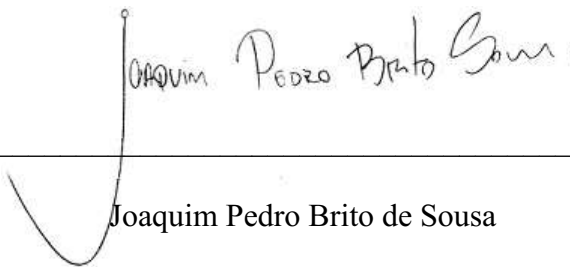
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

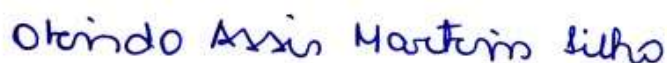
Remodelamento de biomarcadores imunológicos séricos no processo de
envelhecimento

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Programa de Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre



Joaquim Pedro Brito de Sousa

Joaquim Pedro Brito de Sousa



Olindo Assis Martins Filho

Olindo Assis Martins Filho



Angelica de Oliveira Gomes

Angelica de Oliveira Gomes

Uberlândia

2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S725 2022	<p>Sousa, Joaquim Pedro Brito de, 1996- Remodelamento de biomarcadores imunológicos séricos no processo de envelhecimento [recurso eletrônico] / Joaquim Pedro Brito de Sousa. - 2022.</p> <p>Orientador: Olindo Assis Martins Filho. Coorientadora: Angelica de Oliveira Gomes. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.64 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Martins Filho, Olindo Assis ,1966-, (Orient.). II. Gomes, Angelica de Oliveira,1982-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicada
Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 144				
Data:	vinte e dois de fevereiro de dois mil e vinte dois	Hora de início:	09h30min	Hora de encerramento:	12h30min
Matrícula do Discente:	12012IPA004				
Nome do Discente:	Joaquim Pedro Brito de Sousa				
Título do Trabalho:	Remodelamento de biomarcadores imunológicos séricos no processo de envelhecimento				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia das doenças infecciosas e crônico-degenerativas				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Bases Celulares e Moleculares da Resposta Imune em Doenças Infecto-Parasitárias e Crônico-Degenerativas em Humanos e Modelos Experimentais.				

Reuniu-se no dia 22/02/2022, por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Olindo Martins Assis Filho - FIOCRUZ / MG (Presidente) orientador do candidato; Karen Cecília de Lima Torres Navarro - FIOCRUZ / MG; Gabriela Silveira Nunes Abreu - UFJF- GV.

Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof. Dr. Olindo Martins Assis Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

APROVADO(A).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Olindo Assis Martins Filho, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karen Cecília de Lima Torres Navarro, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 11:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriela Silveira Nunes Abreu, Usuário Externo**, em 23/02/2022, às 14:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3398227** e o código CRC **6CAEAF91**.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, porque até aqui me sustentou o Senhor.

Agradeço a minha família (meu pai Welliton, minha mãe Maura e meus irmãos João Paulo e Ana Paula) pelo apoio emocional e financeiro.

Agradeço a minha namorada (Letícia) e minha sogra (Leandra) e sua cachorrinha (Cindy) pelo apoio nas horas mais difíceis durante todo meu mestrado.

Agradeço imensamente ao meu cachorro Sansão, meu companheiro mais fiel, que esteve comigo em todos os momentos.

Agradeço meus poucos, mas leais amigos que não deixam nem o tempo e nem a distância afetar a amizade.

Agradeço meu orientador (Olindo) e minha coorientadora (Angelica) pelas oportunidades e portas que me abriram desde a graduação até aqui. E também a todos os envolvidos no desenvolvimento desse trabalho.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tabela de Quimiocinas

Tabela 2: Tabela de Fatores de Crescimento

Tabela 3: Tabela de Citocinas Pró-Inflamatórias

Tabela 3: Tabela de Citocinas Reguladoras

Lista de Figuras

Figura 1: Quadro das Distribuições da População de acordo com as faixas etárias nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil

Figura 2: Projeção do Índice de Envelhecimento calculado de acordo com ano no Brasil

Figura 3: Heatmap da distribuição populacional de acordo com a faixa etária nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil

Figura 4: Projeção do número absoluto de pessoas acima de 60 anos de acordo com o sexo nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil

Figura 5 - Linha do Tempo Cinética de Quimiocinas Séricas Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 6 - Linha do Tempo Cinética de Fatores de Crescimento Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 7 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Pró-Inflamatórias Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 8 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Reguladoras Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 9 - Linha do Tempo Cinética de Quimiocinas Séricas Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

Figura 10 - Linha do Tempo Cinética de Fatores de Crescimento Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

Figura 11 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Pró-Inflamatórias Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

Figura 12 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Reguladoras Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

Figura 13 – Heatmaps e Assinaturas de Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 14 – Matrizes de Correlações e Redes de Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 15 – Redes de Marcadores Séricos Solúveis em Homens Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 16 – Redes de Marcadores Séricos Solúveis em Mulheres Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 17 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 18 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis em Homens Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 19 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis em Mulheres Durante o Envelhecimento Saudável

Figura 20 – Visão dos Perfis dos Ritmos de Alterações e Conectividade dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável

Sumário

1. Introdução	14
1.1 Epidemiologia do Envelhecimento	14
1.2 Fatores Determinantes do Envelhecimento	19
1.3 <i>Inflammaging</i> e Biomarcadores	22
2. Justificativa	28
3. Objetivos	28
3.1 Objetivos Gerais	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. Materiais e Métodos	29
4.1 Comitê de Ética	29
4.2 População de Estudo	29
4.3 Dosagem de Biomarcadores	30
4.4. Análise Estatística	31
4.4.1 Heatmaps de Marcadores Séricos Solúveis	31
4.4.2 Assinatura de Marcadores Séricos Solúveis	31
4.4.3 Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Matrizes de Correlação	31
4.4.4 Visão Geral dos Ritmos dos Marcadores Séricos Solúveis	32
5. Resultados	32
5.1 Linha do Tempo Cinética dos Marcadores Séricos Solúveis	32
5.2 Linha do Tempo Cinética dos Marcadores Séricos Solúveis de Acordo com o Sexo	38

5.3 Análise de Heatmaps dos Marcadores Séricos Solúveis de Acordo com as Faixas Etárias e Sexo	43
5.4 Assinaturas de Marcadores Séricos Solúveis de Acordo com as Faixas Etárias e Sexo	44
5.5 Análise Integrativa de Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Conectividade com a Vizinhança Durante o Envelhecimento Saudável	45
5.6 Análise Integrativa de Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Conectividade com a Vizinhança Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo	47
5.7 Uma Visão Global dos Ritmos dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo	51
6. Discussão	55
7. Observações Finais	60
8. Referências	60
Anexo 1	69

Resumo

O processo de envelhecimento é um fenômeno complexo que impactam no sistema imune, levando a mudanças nos padrões de secreção de marcadores séricos solúveis. No presente trabalho, os níveis séricos de diversas quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras foram quantificadas por meio de microesferas de alto rendimento em amostras de soro provenientes de 541 indivíduos saudáveis em diferentes faixas etárias (3^{Anos} a >70^{Anos}). Um grande aumento nos marcadores séricos foi observado em 6-10^{Anos} seguido de um declínio em 11-20^{Anos} e 21-30^{Anos}, seguido de uma segunda fase de regulação positiva, que se inicia em 31-40^{Anos}, com subsequente aumento em 51-60^{Anos} e um grande declínio em >70^{Anos}. Em homens, uma segunda onda se inicia precocemente, em 31-40^{Anos}, com pico em 51-60^{Anos} e um declínio suave em >70^{Anos}. De forma diferente, nas mulheres o primeiro pico se estende de 3-5^{Anos} até 6-10^{Anos} e uma segunda onda tem início por volta de 41-50^{Anos}, sendo o pico em 61-70^{Anos}, e em >70^{Anos} é observado uma forte queda. Assim, de forma geral, CCL11, CXCL8, IL-1 β e IL-6 se destacam como biomarcadores ligados a idade universais, logo, durante o envelhecimento saudável, esses marcadores apresentam níveis aumentados após 31-40^{Anos} e TNF apresenta níveis aumentados nas primeiras faixas etárias. A análise de dados demonstrou que a maior conectividade de biomarcadores com a vizinhança ocorre em 3-5^{Anos}, com ritmos distintos de declínio e recuperação entre homens e mulheres. Interessantemente, os rearranjos de reconstrução das redes são mais comuns e mais frequentes nas mulheres (11-20^{Anos}, 51-60^{Anos} e >70^{Anos}) em relação aos homens (21-30^{Anos} e 61-70^{Anos}). De forma geral, esse estudo fornece um panorama abrangente de evidências que ondas, ritmos e redes de conexões distintas são observados durante o envelhecimento saudável, com diferenças de magnitude e tempo relatadas para os sexos.

Palavras-chave: Quimiocinas; Citocinas, Fatores de Crescimento, Envelhecimento;
Sexo

Abstract

The ageing process is a complex phenomenon that impacts the immune system, leading to changes in the pattern of serum soluble mediators. In the present study, the serum levels of several chemokines, pro-inflammatory/regulatory cytokines and growth factors were quantified by high-throughput microbeads array in serum samples from 541 healthy subjects at distinct age ranges (3^{Yrs} to >70^{Yrs}). A broad increase in serum soluble mediators were observed at 6-10^{Yrs} with subsequent decline at 11-20^{Yrs} and 21-30^{Yrs} followed by a second round of upregulation starting at 31-40^{Yrs}, with broad increase at 51-60^{Yrs} and a marked decline at age >70^{Yrs}. Heatmap and signatures of serum soluble mediators demonstrated a bimodal profile with one peak at 6-10^{Yrs} and a second wave around 61-70^{Yrs}. A universal decline was observed later at age >70^{Yrs}. In males, the second wave started earlier at 31-40^{Yrs} with a peak at 51-60^{Yrs} and a further smooth decline towards >70^{Yrs}. Conversely, in females the first peak extended from 3-5^{Yrs} to 6-10^{Yrs} and the second wave starting around 41-50^{Yrs} with a peak at 61-70^{Yrs} followed by a sharp decline at >70^{Yrs}. Overall, CCL11, CXCL8, IL-1 β , IL-6 were underscored as universal age-related biomarkers with higher levels observed at later age ranges (after 31-40^{Yrs}) and TNF with increased levels starting at early age ranges. Data analysis demonstrated that the highest neighborhood connectivity amongst soluble mediators occurred at 3-5^{Yrs}, with distinct declining and strengthening rhythm in males and females. Notably, rebuilding rearrangements were usually earlier and more frequent in females (at 11-20^{Yrs}, 51-60^{Yrs} and >70^{Yrs}) than in males (at 21-30^{Yrs}, 61-70^{Yrs}). Overall, this study provided a comprehensive landscape of evidence that distinct waves, rhythms and dynamic network connectivity are observed along healthy ageing with differences in magnitude and timing reported for sexes.

Key Words: Chemokines; Cytokines; Growth Factors; Ageing; Sexes

1. Introdução

1.1. Epidemiologia do Envelhecimento

Estima-se que em 2050 o número de pessoas idosas ultrapasse a marca 2 bilhões, ressaltando uma mudança na proporção de idosos na população. Apesar dessas alterações parecerem distantes, no cenário atual, o número de pessoas com mais de 60 anos é cinco vezes maior do que o número de crianças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Dados públicos gerados e fornecidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) preveem uma clara mudança no perfil populacional (Figura 1). Alterações abrangem o período de 50 anos. As principais alterações destacadas correspondem ao crescimento da população com mais de 60 anos, passando a corresponder ao maior grupo populacional, e encolhimento da população mais jovem. Esse acontecimento é explicado pelo Índice de Envelhecimento (IE) (Figura 2). O IE é definido como número de pessoas acima de 60 anos a cada 100 pessoas menores de 15 anos residentes em determinado espaço geográfico. O IE é calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{\text{n}^{\circ} \text{ pessoas residentes acima de 60 anos}}{\text{n}^{\circ} \text{ pessoas residentes menores de 15 anos}} \times 1000$$

Com base nesse índice, espera-se o aumento do número de idosos em relação a população com menos de 15 anos de forma progressiva e contínua, uma vez que o gráfico demonstra previsão do aumento do IE sem previsão de atingir um platô. Essa alteração é muito bem representada na Figura 3, onde observa-se o condesamento das faixas etárias e a evolução da concentração ao longo das próximas décadas de forma escalar. Logo, em 2010 as faixas etárias com maior número de indivíduos era entre 10 a 29 anos, e em uma década o grupo populacional mais denso passou a ser de 20 a 39 anos. As projeções de mudança é ainda mais acentuada em 2060. Sendo assim, espera-se que já na próxima década o número de idosos seja superior a 40 milhões e é estimado que em 2060 cerca de um terço da população brasileira tenha mais de 60 anos (Figura 4). Além disso, quando separamos por sexo, mulheres correspondem a maior parte dessa população com mais de 60 anos, sendo crescente essa porcentagem de participação nesse grupo populacional. Sendo estimado que, em 2060, essa diferença que em 2022 é de aproximadamente 4 milhões de indivíduos, passará a ser de 8 milhões.

Entretanto, estudos mostram que a expectativa de vida ao nascimento, no Brasil, reduziu em 1,31 anos entre 2019 e 2021 em decorrência da pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2. O sexo masculino foi o mais afetado, com queda de 1,57 anos em sua expectativa de vida, enquanto no feminino tal queda foi de 0,95 anos. A redução da expectativa de vida ao nascer pode ser ainda maior após o ano de 2021 (CASTRO et al. 2021). Isso significa que frente a novas variáveis, como a pandemia de COVID-19, a mudança no perfil populacional pode acontecer em um ritmo diferente do previsto. Assim, o conhecimento sobre as dinâmicas alterações do sistema imune ao longo do envelhecimento contribui para a formulação de políticas públicas de saúde. Um exemplo atual é a formulação de vacinas, uma vez que a eficácia da resposta vacinal em idosos é menor em comparação a jovens adultos (CLABANTTINI et al. 2018). Ainda, o autor ressalta a importância de considerar *inflammaging*, juntamente com dados clínicos e ômicos para subestratificação da população e assim maior impacto das políticas públicas de saúde (CLABANTTINI et al. 2018).

O processo de envelhecimento é acompanhado de mudanças físicas e mentais e, conseqüentemente, o maior risco do acometimento de doenças. Essas alterações são resultado da soma de danos celulares e moleculares ao longo do curso de vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Figura 1: Quadro das Distribuições da População de acordo com as faixas etárias nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil Os gráficos de linhas de séries temporais múltiplas representam a destruição da população para os anos de 2010, 2020, 2030, 2040, 2050 e 2060.

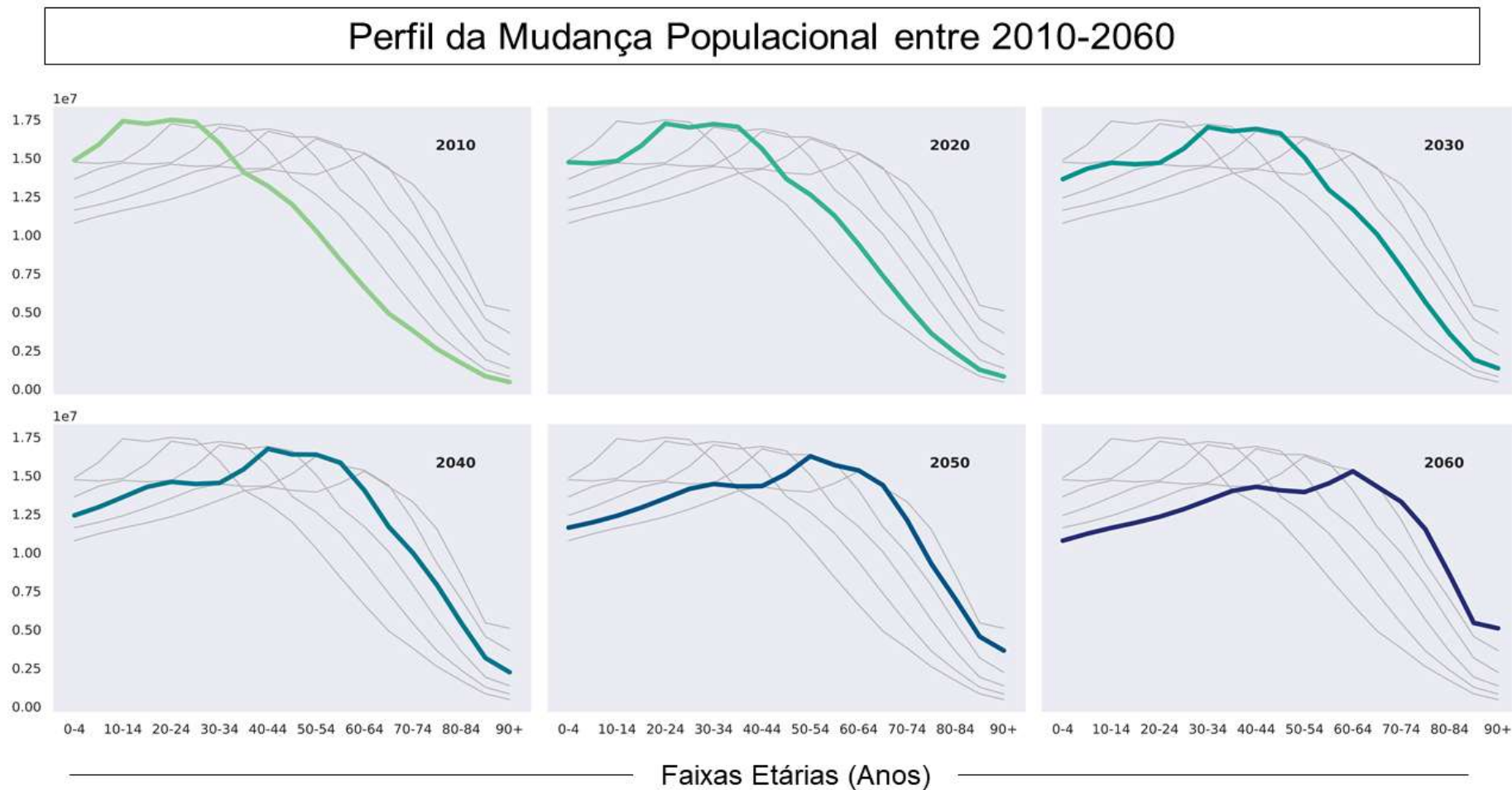


Figura 1

Fonte: Projeções feitas pelo autor com dados fornecidos pelo IBGE até a década de 2060.

Figura 2: Projeção do Índice de Envelhecimento calculado de acordo com ano no Brasil Índice calculado para os anos de 2010, 2020, 2030, 2040, 2050 e 2060 com base no número de indivíduos residindo no Brasil com mais de 60 anos em relação a indivíduos com menos de 15 anos.

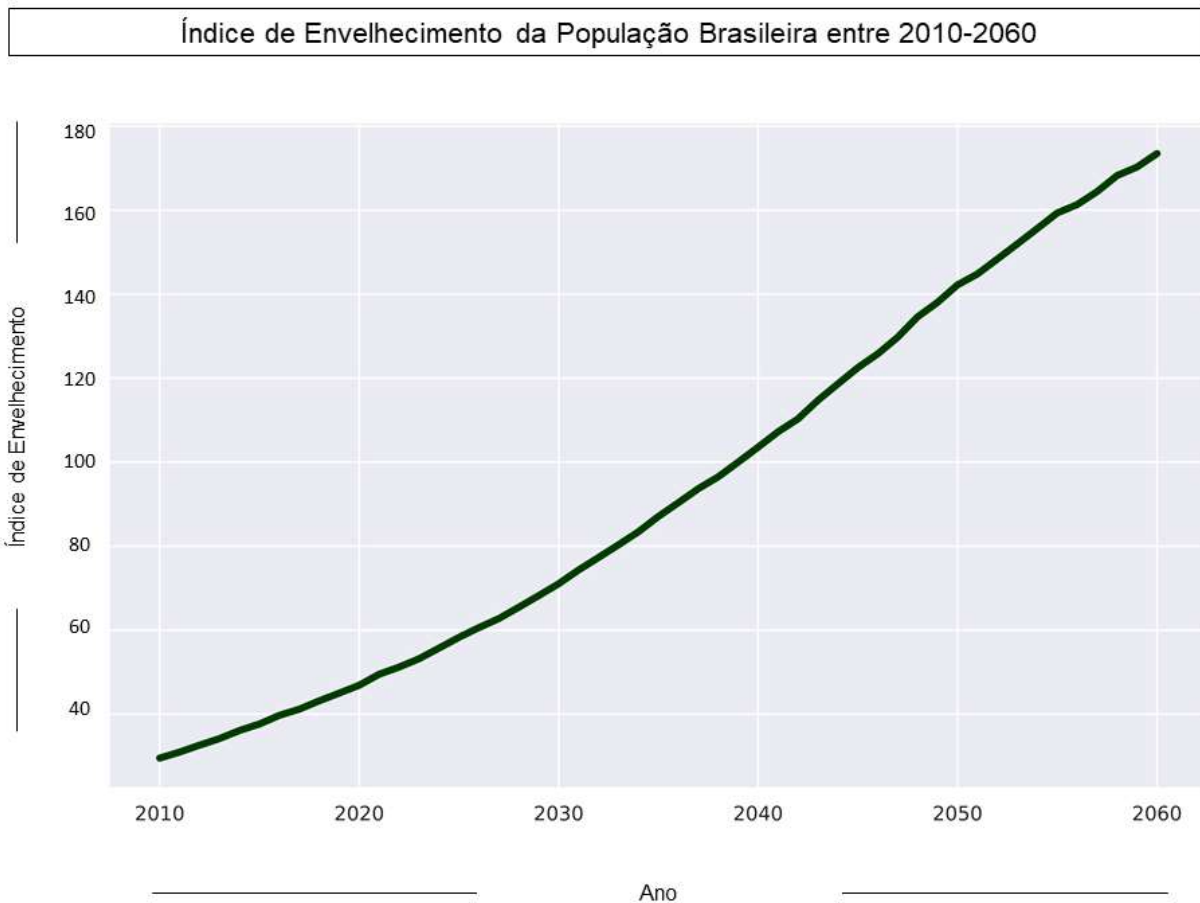


Figura 2

Fonte: Projeção feita pelo autor com dados fornecidos pelo IBGE até a década de 2060.

Figura 3: Heatmap da distribuição populacional de acordo com a faixa etária nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil Heatmap da distribuição populacional brasileira construído para visualização do padrão de arranjo para os anos de 2010, 2020, 2030, 2040, 2050 e 2060.

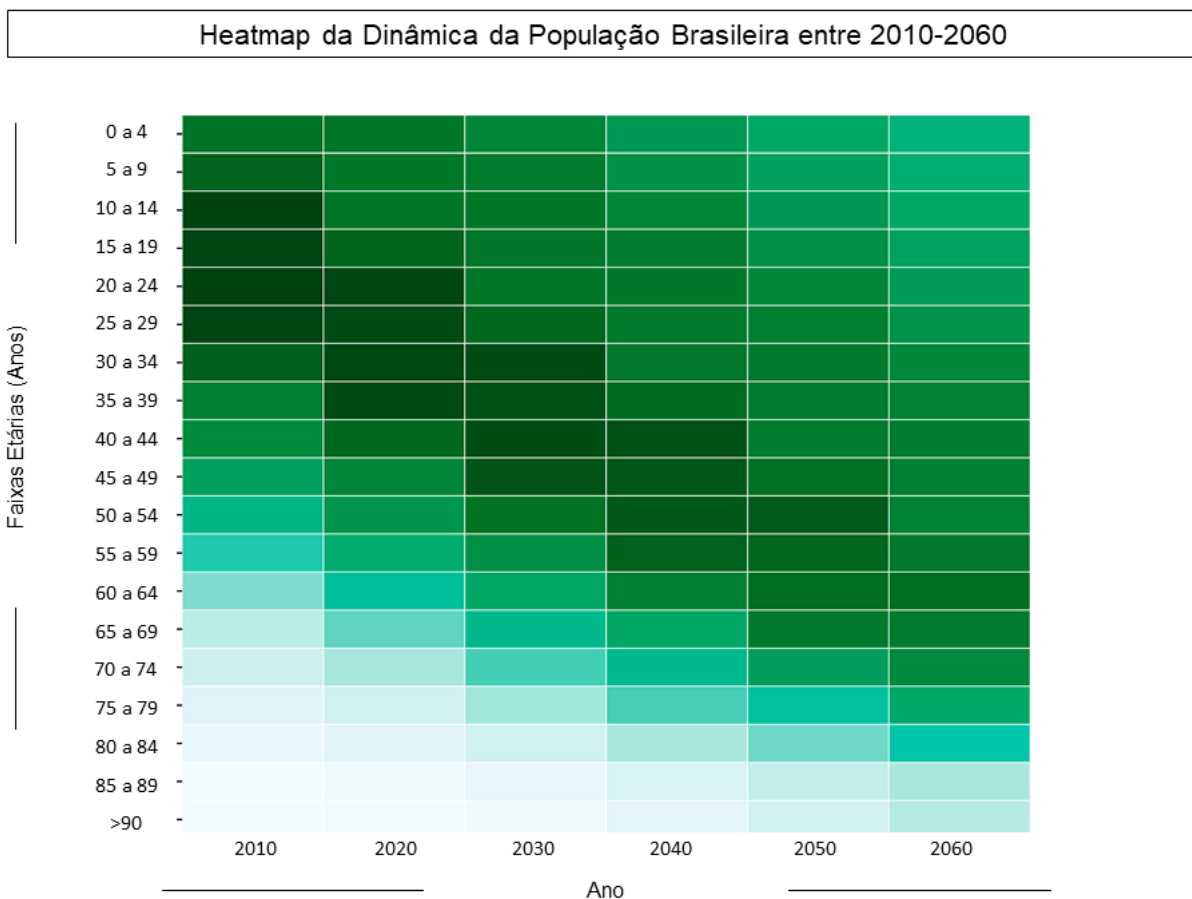


Figura 3

Fonte: Projeção feita pelo autor com dados fornecidos pelo IBGE até a década de 2060.

Figura 4: Projeção do número absoluto de pessoas acima de 60 anos de acordo com o sexo nas décadas de 2010 a 2060 no Brasil Gráfico de linhas representando o número absoluto de indivíduos acima de 60 anos para as décadas de 2010, 2020, 2030, 2040, 2050 e 2060. Inicialmente toda população foi representada (■), e em seguida os indivíduos foram segregados de acordo com o sexo (homens = ■ e mulheres = ■).

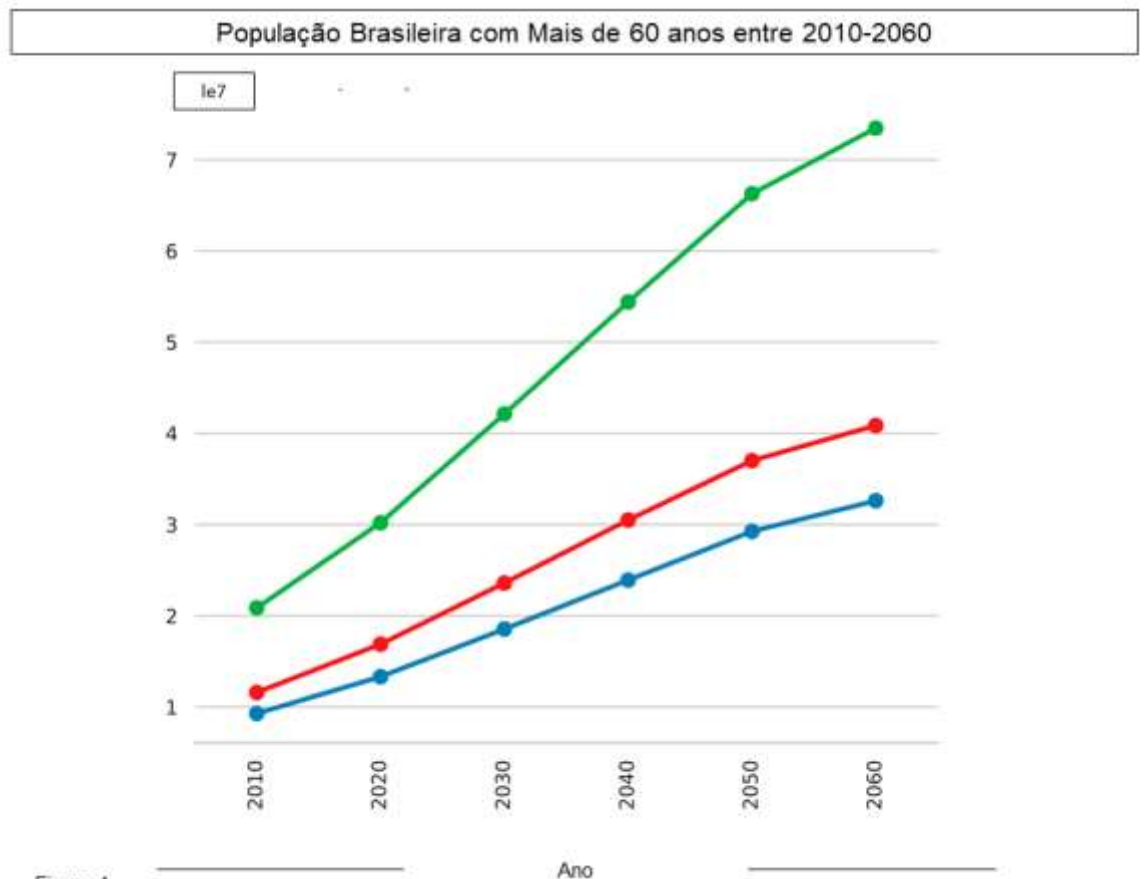


Figura 4

Fonte: Projeção feita pelo autor a partir de dados fornecidos pelo IBGE até a década de 2060.

1.2. Fatores Determinantes do Envelhecimento

Há temas-chave quando aborda-se o processo de envelhecimento. Têm-se aqueles que podem-se dizer que guiam o envelhecimento do organismo e são processos altamente interligados, uma vez que descrevem conjuntos sobrepostos de cinco a dez processos. Esses processos são: Adaptação ao estresse, células-tronco e regeneração celular e tecidual, danos macromoleculares, alterações epigenéticas, *inflammaging* e proteostase (KENNEDY, et al., 2014). O conjunto de conhecimentos forma o campo da *Geroscience*, uma ciência interdisciplinar que visa a compreensão do envelhecimento e suas doenças relacionadas, assim como prevenção e cura desses acometimentos (FRANCESCHI, et al., 2017).

Alterações fisiológicas relacionadas a idade afetam diversos sistemas e funções corporais, e a manutenção da homeostasia depende de uma remodelação contínua das interações celulares, estrutura celular e funções de órgãos (AKHA, S, 2018). Nesse contexto, dois tipos de células tronco são encontradas em organismos adultos, as células tronco adultas, que são responsáveis pela regeneração tecidual, e células tronco germinativas, responsáveis pela formação dos gametas. (LI E XIE, 2005). Apesar das células tronco adultas estarem presentes durante toda a vida do organismo, sua desempenho não é constante. Assim, sua perda de atividade está associada a doenças ligadas ao envelhecimento (como aterosclerose e diabetes tipo 2 e funções imunológicas reduzidas) e considerada uma das marcas da senescência do organismos. (LOPEZ-OTIN, et al., 2013; SIGNER E MORRISON, 2013; VILCHEZ, et al. 2014).

Existe uma rede complexa de mecanismos celulares que regula a qualidade do proteoma. Essa rede de mecanismos é conhecida como proteostase e tem por função o monitoramento de diversas características das proteínas produzidas, como concentração proteica, dobramento e localização celular. Além disso a monitoração das interações de proteínas, da síntese até a degradação, que é de extrema importância para o funcionamento celular. (BALCH, et al. 2008; POWERS, et al. 2009; TAYLOR E DILLIN, 2011; VILCHEZ, et al. 2014). A proteostase não é estável durante toda a vida do organismo, apresentando um declínio durante o processo de envelhecimento. Com isso, um defeito na proteostase acarreta alterações da homeostase em diversos sistemas (BALCH, et al. 2008; VILCHEZ, et al. 2014). Assim, vias que promovem a proteostase se correlacionam com o aumento da longevidade, como é o caso da redução da sinalização via insulina/IGF-1 (IIS). Essa redução leva ao acúmulo nuclear de fatores de transcrição FOXO (*Forkhead box O*), e consequente regulação de genes que promovem aumento da resistência a estresse (BARTKE, 2008; PANOWSKI E DILLIN, 2009; TAYLOR E DILLIN, 2011; VILCHEZ, et al. 2014, MARTINS, et al. 2016). Além disso, estudos com comundongos mostraram que esses fatores de transcrição são reguladores da renovação e proliferação tanto de células tronco neurais (NSCs) quanto de células tronco hematopoiéticas (HSCs) (MIYAMOTO, et al. 2007; TOTHOVA, et al. 2007; PAIK, et al. 2009; MARTINS, et al. 2016).

Algumas mudanças epigenéticas registram o envelhecimento, como o aumento de metilação do DNA de genes relacionados a via de sinalização celular, e o aumento de desmetilação do DNA em regiões gênicas relacionadas as funções de matriz celular. Fornecendo pequenas evidências do remodelamento epigenético que sustenta o envelhecimento

(LI, et al., 2017). No entanto, é possível que macromoléculas presentes na dieta possam reverter essas metilações relacionadas com o envelhecimento. Macromoléculas essas que são dependentes da microbiota intestinal (GADECKA E BIELAK-ZMIJEWSKA, 2019).

A longevidade pode ser influenciada pelo DNA mitocondrial, alterando parâmetros como encurtamento de telômero e disfunção mitocondrial. Além disso, o DNA mitocondrial influencia também proteostase mitocondrial e geração de espécies reativas de oxigênio, sinalização de insulina e obesidade. Essas alterações são estruturadas pela rede de resposta mitocondrial ao estresse. Nessa rede, proteostase, mtUPR e sinalização de ROS desencadeiam respostas que afetam o envelhecimento do organismo (LATORRE-PELLICER, 2016).

O envelhecimento está amalgamado a um baixo grau de inflamação crônica. Fato que é causa e consequência do processo de envelhecimento (FRANCESCHI, et al. 2000; GADECKA E BIELAK-ZMIJEWSKA, 2019). A exemplo, a citocina pró-inflamatória IL-6 é observada aumentada em acometimentos como diabetes, doenças cardiovasculares e declínio cognitivo, que contribuem para o aumento do risco de morte. Essas condições também estão diretamente relacionadas ao envelhecimento. (SINGH E NEWMAN, 2011; LIMA-COSTA, et al. 2017).

Fatores ambientais, como a alimentação, também apresentam impacto nesse processo complexo que é o envelhecimento, por exemplo Guedj e colaboradores. (2020) demonstrou que dietas ricas em gorduras leva ao aumento da expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , o que propicia a diminuição da capacidade de reparo de danos ao DNA. Os autores mostraram também que com a manipulação da microbiota local é possível reverter danos associados ao envelhecimento ao auxiliar a resposta celular em reparo a danos no DNA.

No estudo do envelhecimento, cães passaram a ser usados como modelo, uma vez que os humanos e *Canis lupus familiaris* compartilharam as mesmas pressões ambientais, como alimento, água e patógenos, por um período de aproximadamente 30.000 anos, que corresponde ao período de domesticação. O que conferiu processo de envelhecimento semelhante entre homens e cães (BOTIGUE et al. 2017; HOFFMAN et al. 2018; NICHOLATOS et al. 2019).

Nicholatos e colaboradores (2019) em estudos utilizando cães com expectativa de vida muito distintas como modelo experimental, observou que em raças que possuem maior expectativa de vida possuem maiores taxas de catabolismo e β -oxidação. Em contraste com raças de cães que possuem pouca expectativa de vida, nas quais eram observadas maior acúmulo de aminoácidos e derivados de ácidos graxos. Essa diferença se dá pela presença de mitocôndrias desacopladas, menor escape de elétrons, maior respiração celular e respectiva capacidade respiratória nos cães com maior expectativa de vida. Em consequência reduz os

níveis de espécies reativas de oxigênio, promove a tolerância ao estresse celular e possibilita prevenir o enrijecimento do citoesqueleto de actina. Esses resultados sugerem que diferenças bioquímicas influenciam no processo de envelhecimento. Outro mecanismo potencial para as diferentes expectativas de vida são as taxas glicolíticas mais altas e danos ao DNA que são observadas em cães de grande porte (JIMENEZ, et al. 2018).

A mitocôndria assume papel de relevância também ao se relacionar com a imunidade, através de sinais que modulam a inflamação e o sistema imune. Essa modulação ocorre através de DNA mitocondrial (mtDNA), proteínas mitocondriais e *N*-formil peptídeos. mtDNA no citoplasma mostrou levar a ativação de caspase-1 e secreção de IL-1 β e IL-18 em macrófagos. Além disso, mtDNA é reconhecido por Toll *like receptor* 9 (TLR9), sendo fundamental para síntese de citocinas que promovem a inflamação. E ainda, mtDNAs se encontram elevados em indivíduos idosos. *N*-formil peptídeos também promovem síntese de citocinas pró inflamatórias, ativando o sistema imune inato o que culmina em uma inflamação sistêmica. Esses achados contribuem com a noção de que os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) mitocondriais contribuem para doenças associadas com a velhice, o que os tornam contribuintes também da senescência do sistema imune (NAKAHIRA, et al. 2011; RAOOF, et al., 2010; HILL E REMMEN, 2014).

1.3. *Inflammaging* e Biomarcadores

O termo *inflammaging* foi recentemente cunhado, após agregação de conhecimento interdisciplinar, para se referir ao processo de senescência do sistema imune e a contribuição do mesmo processo no envelhecimento do organismo. Com isso, *inflammaging* entrou em voga no início do século XXI, com o debate do envelhecimento do sistema imune, e as contribuições do sistema imune inato e adaptativo, como causa e consequência do envelhecimento fisiológico, sendo um dos sete pilares do envelhecimento (KENNEDY, et al., 2014; FULOP, et al., 2014; FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019). Na senescência do sistema imune é observado um aumento gradual e contínuo do estado pró-inflamatório (FRANCESCHI, et al., 2006). Esse estado pró-inflamatório parece ser explicado pelo fenótipo não fixado como SASP (do inglês *senescence-associated secretory phenotype* ou fenótipo secretório associado a senescência). Esse fenótipo é caracterizado pela produção de citocinas como IL-6, IL-7, IL-8, MCP-2 (CCL-8) e MIP-3a (CCL-20), fatores de crescimento (GRO, HGF e IGFBPs), moléculas de superfície (ICAMs, uPAR, e receptores de TNF). Esses componentes imunomoduladores levam a efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (COPPÉ et al., 2008; KENNEDY, et al., 2014). Além disso, diferentes marcadores exercem diversos efeitos no sistema imune, como quimiotaxia (tabela 1)

e estímulos de proliferação de diversos tipos celulares (tabela 2), assim como aumento (tabela 3) e controle da inflamação (tabela 4).

Tabela 1: Tabela de Quimiocinas Tabela contendo informações sobre principais produtores e ações das quimiocinas CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10.

Marcador	Principais Células Produtoras	Ações	Referências
CCL11	Células epiteliais, fibroblastos e células musculares lisas.	Produção, ativação e quimiotaxia de eosinófilos.	KITAURA <i>et al.</i> , 1996; ZLOTNIK; YOSHIE, 2012.
CXCL8	Grande variedade de células, monócitos, neutrófilos, macrófagos, queratinócitos.	Recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação ou infecção.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
CCL3	Secretada por diversas células, incluindo monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos.	Participa no desenvolvimento do processo inflamatório, por atração quimiotática de células T, células dendríticas, eosinófilos, monócitos e basófilos para os locais de inflamação e infecção. Papel importante na diferenciação de células Th1 ao modular IFN- γ a partir de linfócitos T auxiliares.	MENTEN; WUYTS; VAN DAMME, 2002.
CCL4	Monócitos, células NK e neutrófilos.	Regulação do tráfego de leucócitos, modulação da produção de citocinas por células T auxiliares, aumentando a produção de IFN- γ por linfócitos T ativados, induzindo uma resposta Th1.	KARPUS <i>et al.</i> , 1997; MENTEN; WUYTS; VAN DAMME, 2002.
CCL2	Produzida por uma variedade de células	Quimiotaxia e ativação de monócitos, células T ativadas, basófilos, células NK e células dendríticas imaturas. Papel importante na diferenciação de células T auxiliares no subtipo Th2.	DESHMANE <i>et al.</i> , 2009; KARPUS <i>et al.</i> , 1997
CCL5	Regulada e ativada por células T.	Atração de eosinófilos e linfócitos T ativados para os locais de infecção.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011
CXCL10	Fibroblastos e principalmente células T ativadas.	Atividade quimiotática forte para linfócitos Th1, estimula a atração de monócitos e células NK, modula a expressão de moléculas de adesão e indução de apoptose.	ANTONELLI <i>et al.</i> , 2006; CARDOSO <i>et al.</i> , 2018

Tabela 1

Fonte: do autor.

Tabela 2: Tabela de Fatores de Crescimento Tabela contendo informações sobre principais produtores e ações dos fatores de crescimento: FGF-básico, VEGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7.

Marcador	Principais Células Produtoras	Ações	Referências
FGF-básico	Variedade de células, como monócitos, hepatócitos, células endoteliais e neurais.	Papel durante o desenvolvimento pré-natal, regulando a angiogênese e a proliferação de células placentárias. E remodelamento ou reparo epitelial por meio da expressão de quimiocinas envolvidas na angiogênese em novo grupo de células T auxiliares, Th22.	EYERICH <i>et al.</i> , 2009.
VEGF	Células endoteliais, epiteliais, macrófagos e linfócitos.	Mitógeno para células endoteliais, essencial no desenvolvimento e diferenciação do sistema vascular, estimulando a proliferação e sobrevivência de células endoteliais e promove permeabilidade vascular na angiogênese.	DVORAK <i>et al.</i> , 1995; ROSA, 2018.
PDGF	Plquetas.	Mitógeno e quimioatraente para vários tipos celulares, incluindo células ósseas, mesenquimais e cartilaginosas.	OUYANG <i>et al.</i> , 2018.
G-CSF	Variedade de células, principalmente por linfócitos T ativados, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais.	Auxílio na diferenciação na medula óssea e controle de liberação na corrente sanguínea de neutrófilos.	BASU; DUNN; WARD, 2002.
GM-CSF	Células T ativadas, células endoteliais, macrófago e fibroblastos.	Auxílio na diferenciação de monócitos e macrófagos, maturação de células dendríticas e promove maturação de monócitos e neutrófilos na medula óssea.	BECHER; TUGUES; GRETER, 2016.
IL-2	Lifócitos TCD4 ⁺ .	Estímulo da proliferação e diferenciação de linfócitos T específicos para antígenos.	ABBAS, 2015; AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-7	Células epiteliais, células dendríticas, queratinócitos, monócitos e por fibroblastos.	Proliferação de linfócitos B e T <i>naive</i> e a sobrevivência de células T inativas e de memória.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.

Tabela 2

Fonte: do autor.

Tabela 3: Tabela de Citocinas Pró-Inflamatórias Tabela contendo informações sobre principais produtores e ações das citocinas pró-inflamatórias: IL-1b, IL-6, TNF, IL-12, IFN-g, IL-15 e IL-17.

Marcador	Principais Células Produtoras	Ações	Referências
IL-1b	Macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos e hepatócitos.	Maturação de linfócitos B e estimulação de células T por meio da liberação de IL-2, promove a diferenciação de células T auxiliares em Th17, regulada pelo seu receptor (IL-1RI) e pelas interleucinas IL-7 e IL-15.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011; BURGLER <i>et al.</i> , 2009.
IL-6	Células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos.	Participa de respostas inflamatórias de fase aguda, da regulação da resposta imune, da hematopoiese, e também na diferenciação de células Th17, via produção de IL-17.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011; RAPHAEL <i>et al.</i> , 2015.
TNF	Produzido diversas células, como macrófagos, monócitos, células <i>Natural Killer</i> (NK), linfócitos e células dendríticas.	Citocina pró-inflamatória envolvida nas respostas celulares Th1, papel citotóxico em uma ampla variedade de células tumorais.	BRADLEY, 2008.
IL-12	Monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas.	Estímulo de células NK, mediação do desenvolvimento e manutenção de células Th1, induz a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e células NK.	CHAN <i>et al.</i> , 2006; HSIEH <i>et al.</i> , 1993.
IFN-g	<i>Natural killers</i> (NK) e também produzidas pelo subgrupo de células Th1.	Estímulo de funções de células linfoides e respostas antimicrobianas e antitumorais por macrófagos, células NK e neutrófilos. Recrutamento de marcadores inflamatórios para os locais de infecções.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011; BILLIAU; MATTHYS, 2009.
IL-15	Variedade de células (imunes e não imunes), por exemplo macrófagos e queratinócitos.	Estímulo da proliferação, sobrevivência e ativação de células NK e consequente produção de IFN- γ , e a proliferação e sobrevivência de linfócitos T CD8+ de memória	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-17	Células Th17, linfócitos T citotóxicos e células linfoides inatas.	Participa de respostas a microrganismos (como fungos e bactérias extracelulares), induz inflamação rica em neutrófilos, por meio da estimulação de citocinas (TNF) e quimiocinas (CXCL8).	KORN <i>et al.</i> , 2009.

Tabela 3

Fonte: do autor

Tabela 3: Tabela de Citocinas Reguladoras Tabela contendo informações sobre principais produtores e ações das citocinas reguladoras: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

Marcador	Principais Células Produtoras	Ações	Referências
IL-1ra	Células epiteliais, monócitos, neutrófilos, macrófagos e fibroblastos.	Inibição das inflamações causadas por IL-1, auxiliando na regulação da inflamação.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-4	Mastócitos e eosinófilos e por células T ativadas.	Estimula a diferenciação de células do subgrupo Th2	ABBAS, 2015; AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-5	Mastócitos e células Th2.	Estimulação da proliferação e ativação de eosinófilos, aumentando sua capacidade na liberação dos grânulos, importantes para a destruição de helmintos e podendo também danificar tecidos do hospedeiro.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-9	Produzidas por células Th2 e Th9, mastócitos e eosinófilos	Ativação e sobrevivência de linfócitos B e T, células teciduais e mastócitos, inibir a produção de citocinas Th1, e induzir a produção de IgE e de muco nas células epiteliais brônquicas.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-10	Quase todas as células imunes, incluindo linfócitos B e T, monócitos e células dendríticas.	Citocina significativamente imunossupressora, inibi a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 e IL-6, a apresentação de antígenos, a proliferação celular e aumentar as respostas imunes humorais.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.
IL-13	Princiálmente células do subgrupo Th2, e também basófilos, eosinófilos e células NK.	Ativar a produção de linfócitos B e induzir a troca de classe de imunoglobulina G (IgG) para a imunoglobulina E (IgE), inibir a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias (papel regulador), como a IL-1 β e participa da ativação alternativa de macrófagos, contribuindo para a reparação e fibrose tecidual.	AKDIS <i>et al.</i> , 2011.

Tabela 4

Fonte: do autor

Inflammaging é o conceito ampliado e enriquecido de um campo de estudo imunológico associado a imunossenescência. Esta se refere principalmente a imunidade adaptativa, na qual os linfócitos T e B apresentam respostas menos eficientes, em indivíduos idosos, frente a infecção por patógenos ou em resposta ao estresse crônico (FULOP, et al., 2018; PAWELEC, 2018; FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019). A imunidade adaptativa é influenciada pela idade e pelo sistema imune inato, apresentando exaustão de linfócitos T após exposição repetida

a patógenos e danos celulares. Assim, a imunidade adaptativa fica impedido de apresentar efeito regulador na imunidade inata, levando assim ao *Inflammaging* (FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019). Os dois fenômenos imunológicos aqui postos são extremamente dinâmicos, não lineares e parecem progredir em paralelo (FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019).

Ao contrário do que se esperaria do efeito de linfócitos T reguladores, que poderia conter a inflamação e conseqüentemente o *inflammaging*, os efeitos imunossupressores desse perfil de resposta parece aumentar tanto *inflammaging* quanto a imunossenescência. Isso se dá pela inibição da capacidade de eliminação total do causador da inflamação, contribuindo para uma inflamação residual (FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019).

Com frequência a inflamação crônica é observada como parte de mecanismos patológicos em doenças relacionadas com idade, como doenças crônicas neurodegenerativas, respiratórias e cardiovasculares, além de diversos tipos de cânceres (FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019). O que destaca a importância do *inflammaging* como biomarcador para doenças relacionadas a idade, apontando para o surgimento das mesmas antes do início dos sinais clínicos, possibilitando um ganho no tratamento e na sobrevivência dos pacientes.

Comumente, a inflamação e as vias que a promovem são vistas como biomarcadores que sinalizam para o desvio da normalidade fisiológica. Assim, os biomarcadores sugerem alterações de maneira indireta e inespecífica. Isso é relevante quando se trata de intervenção, onde o alvo não deve ser o biomarcador inespecífico, mas sim a (s) via (s) associada (s) à falha de órgão / sistema relacionada à inflamação (FULOP, LARBI E WITKOWSKI, 2019).

Embora os dados científicos atuais sobre o envelhecimento e a resposta imune sejam de grande importância, eles ainda não são suficientes para explicar as mudanças observadas em populações distintas. Uma proposta é que esse fenômeno biológico sofre interferência da interação entre genética e fatores ambientais (MINCIULLO et al., 2015). Assim, populações que vivem em diferentes ambientes, logo estão expostos a uma diversidade de estímulos, virão a apresentar um histórico próprio de contatos com agentes infecciosos e de microbiota apresentando assim uma imunobiografia gerando uma imunossenescência particular. (FRANCESCHI et al, 2017).

Então, visando fornecer informações detalhadas sobre ondas de mudanças nos marcadores séricos solúveis em conjunto com suas redes durante o envelhecimento saudável, o presente trabalho investigou o perfil sérico de quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras na população brasileira de indivíduos saudáveis entre 3 anos e

>70 anos. Assim nossos achados fornecem evidências científicas sobre os detalhes de mudanças tanto em magnitude quanto em tempo que são observadas durante o envelhecimento saudável relatado para homens e mulheres.

2. Justificativa

O envelhecimento humano é um processo complexo que afeta diversos sistemas no organismo e envolve o remodelamento das interações célula-célula e das secreções de marcadores séricos solúveis, como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento para manutenção constante da homeostasia (SIMON et al., 2005; AKHA, S, 2018). Assim, entender os fatores bióticos que interferem nesse processo contínuo é de suma importância para a promoção de saúde, tanto pública como individual, nesse contexto. Estudar a população brasileira saudável serve para o estabelecimento de referência dentro do tema de *inflammaging*, uma vez que esse é considerado um dos pilares do envelhecimento. Sendo assim, considerando as lacunas de conhecimento nessa área, o presente estudo buscou preenche-las, uma vez que o perfil populacional mundial está sofrendo uma mudança significativa, com o crescimento da população acima de 60 anos e encolhimento da população juvenil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Essa condição não é diferente na população brasileira, segundo o IBGE, as projeções para a década de 2060 sugerem que a população com mais de 60 anos supere os 70 milhões de habitantes, correspondendo a mais de um terço da população brasileira, sendo o grupo populacional que mais cresce. Logo se faz necessário mais que depressa dados científicos sobre a temática a fim de melhor preparar profissionais de saúde e pesquisadores, e também no auxílio ao traçar políticas públicas voltadas para o manejo dessa população. Diante desse quadro, o estudo proposto servirá de suporte para um aprofundar o entendimento do processo de envelhecimento saudável pelo ponto de vista imunológico a partir de dados robustos de homens e mulheres de diferentes faixas etárias, contribuindo para teoria de *inflammaging* e conseqüentemente para o tema de *geroscience*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as alterações dos parâmetros imunológicos nas diferentes faixas etárias de indivíduos saudáveis, da infância a velhice.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Avaliar o perfil de quimiocinas séricas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10) e o ritmo de sua concentração sérica no decorrer do envelhecimento de pacientes saudáveis, de acordo com sexo e idade;

3.2.2. Avaliar o perfil de fatores de crescimento séricos (FGF-básico, VEGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) e o ritmo de sua concentração sérica no decorrer do envelhecimento de pacientes saudáveis, de acordo com sexo e idade;

3.2.3. Avaliar o perfil de citocinas pró-inflamatórias séricas (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15 e IL-17) e o ritmo de sua concentração sérica no decorrer do envelhecimento de pacientes saudáveis, de acordo com sexo e idade;

3.2.4. Avaliar o perfil de citocinas reguladoras séricas (IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) e o ritmo de sua concentração sérica no decorrer do envelhecimento de pacientes saudáveis, de acordo com sexo e idade;

3.2.5. Avaliar o perfil de conectividade entre os marcadores séricos solúveis e seu ritmo no decorrer do envelhecimento de pacientes saudáveis, de acordo com sexo e idade;

4. Materiais e Métodos

4.1 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas (CPqRR), localizado em Belo Horizonte – MG, sob parecer número 4.030.110 (CAAE 82357718.5.0000.5091) (Anexo 1).

4.2 População de Estudo

Para o estudo foram utilizadas amostras provenientes de 541 indivíduos saudáveis de ambos os sexos com idade entre 2 e 100 anos, que compareceram a unidades básicas de saúde (UBS) da cidade de São Paulo - SP para vacinação antiamebílica-17DD (Bio-Manguinhos-FIOCRUZ) durante campanha de vacinação oferecida pelo Ministério da Saúde no ano de 2018.

A coleta das amostras de sangue foi realizada antes da vacinação. Utilizando tubos de coleta a vácuo sem anticoagulante e com gel separador, foram obtidos 7 ml de sangue de cada participante. O material biológico foi mantido em condições ideais e encaminhadas ao Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do CPqRR/FIOCRUZ,

e armazenadas em alíquotas de 500µL em criotubos mantidos a -80°C. O soro foi obtido por meio de centrifugação (1.400 x g, por 10 minutos, temperatura ambiente).

Os indivíduos selecionados para o estudo foram categorizados em diferentes grupos de idade contínua:

- Grupo 1: Crianças de 03 anos a 5 anos (7 homens e 12 mulheres);
- Grupo 2: Crianças de 06 anos a 10 anos (23 homens e 12 mulheres);
- Grupo 3: Crianças de 11 anos a jovens adultos de 20 anos (22 homens e 21 mulheres);
- Grupo 4: Jovens adultos de 21 anos a 30 anos (31 homens e 39 mulheres);
- Grupo 5: Adultos de 31 anos a 40 anos (24 homens e 51 mulheres);
- Grupo 6: Adultos de 41 anos a 50 anos (34 homens e 61 mulheres);
- Grupo 7: Adultos de 51 anos a 60 anos (41 homens e 53 mulheres);
- Grupo 8: Idosos de 61 anos a 70 anos (27 homens e 46 mulheres);
- Grupo 9: Idosos com mais de 70 anos (21 homens e 16 mulheres).

Não houve cálculo para determinar previamente o tamanho do n amostral de cada faixa etária.

4.3 Dosagem de Biomarcadores

As amostras referidas acima foram usadas para dosagem de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. As amostras utilizadas foram mantidas em freezer -80°C até a realização dos experimentos. A quantificação ocorreu no LBDM do CPqRR/FIOCRUZ utilizando o kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay.

Os ensaios foram realizados seguindo as recomendações do fabricante, para dosagem de quimiocinas séricas: CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5 e CXCL10. Fatores de crescimento séricos: FGF-básico, VEGF, PDGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7. Citocinas pró-inflamatórias séricas: IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ, IL-15 e IL-17. E citocinas reguladoras séricas: IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13.

Foi utilizado software específico para análise dos dados obtidos. As curvas de calibrações utilizadas foram construídas a partir dos padrões fornecidos pelo kit. As concentrações dos biomarcadores analisados foram fornecidas em pg/mL por meio dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) após a leitura de fluorescência.

Os resultados foram tabulados em planilha Excel e posteriormente, transcritos para software estatísticos para devidas análises.

4.4 Análise Estatística

Inicialmente foi avaliado as diferenças entre as médias. Quando as amostras eram consideradas com distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico T. Quando as amostras não apresentavam distribuição normal, o teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para medir a diferenças entre as medianas. A normalidade das amostras foi dada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Já a homogeneidade das amostras foi atestada através do teste de Levene.

Para avaliar as associações entre a secreção dos biomarcadores avaliados de acordo com a idade e o sexo dos indivíduos, foi utilizado teste de Correlação de Pearson, quando amostras apresentavam distribuição normal, e Correlação de Spearman, quando não apresentavam distribuição normal. Primeiro realizou-se a análise considerando toda população (homens e mulheres), em seguida as amostras foram categorizadas por sexo e faixa de idade.

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

4.4.1 Heatmaps de Marcadores Séricos Solúveis

Com auxílio das funções `heatmap.2` e `gplots` do software R (Projeto para Computação Estatística Versão 3.0.1), os heatmaps foram construídos a partir dos valores de Z score estabelecidos para cada marcador sérico de acordo com as faixas etárias, com escala variando de -2 a +2. Inicialmente foi considerado a população total, e posteriormente os indivíduos foram subgrupados de acordo com o sexo.

4.4.2 Assinatura de Marcadores Séricos Solúveis

A assinatura dos marcadores séricos solúveis foi determinada a partir da conversão de uma variável quantitativa contínua, expressa em pg/mL, em uma variável categórica, expressa em proporção percentual (%). Para tal, foi considerado o 33º percentil de cada marcador como cut-off, e assim foi determinado qual porcentagem de indivíduos tinha concentração sérica acima do limite estabelecido. Ao final, as assinaturas foram apresentadas na forma de gráfico de radar.

4.4.3 Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Matrizes de Correlação

Com base nos valores de correlação fornecidos pelos testes de Correlação de Pearson e Correlação de Spearman, redes de biomarcadores foram construídas. Esse teste possibilitou a avaliação de associação positiva e negativa entre os níveis de quimiocinas séricas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras para cada faixa etária estabelecida. As

associações foram mapeadas e montadas para toda a população e para cada gênero em layout de rede, por meio do software Cytoscape (Versão 3.8.2). As redes compreendem todos marcadores, estes foram representados por nós ou vértices. Quando significativos ($p < 0,05$) os vértices foram conectados pelas arestas de acordo com índices de correlação gerado pelos testes. A posição dos nós é dado de acordo com a centralidade, ou seja, de acordo com o número de conexões vizinhas com os nós adjacentes.

Em conjunto, foi construído matrizes de correlação utilizando valores de r de Pearson e r de Spearman quando significativos ($p < 0,05$). As matrizes foram construídas utilizando a biblioteca corrplot (0.90) do software R (Projeto para Computação Estatística Versão 3.0.1).

4.4.4 Visão Geral dos Ritmos dos Marcadores Séricos Solúveis

Para resumir o ritmo dos marcadores séricos solúveis, foi considerado a concentração sérica de cada marcador para cada faixa etária em relação a mediana global, sendo valores expressos em aumentos relativos (>1). Assim, foi construído gráfico de barras e linhas associadas ilustrando a estrutura proteica de cada marcador aumentado. A estrutura foi gerada pela plataforma on-line SWISS MODEL (disponível em: <https://swissmodel.expasy.org>) que utiliza software de modelagem-homologia de estrutura de proteica (GUEX et al., 2009; WATERHOUSE et al., 2018) com base na sequência alvo fornecida pelo Banco de Dados de Proteínas (BERMAN et al., 2003).

5. Resultados

5.1 Linha do Tempo Cinética dos Marcadores Séricos Solúveis

Para descrever de forma linear a cinética da concentração de marcadores solúveis séricos, quimiocinas (figura 5), fatores de crescimento (figura 6), citocinas pró-inflamatórias (figura 7) e reguladoras (figura 8) foram mensurados em amostras de soro de pacientes saudáveis e os valores comparados entre as faixas etárias adjacentes. A análise dos dados mostrou aumento de mediadores solúveis em 6-10^{Anos} (IL-7, TNF, IL-17, IL-9, IL-13) e redução na concentração sérica de CXCL10. Inversamente, em 11-20^{Anos}, foi observado redução nos níveis séricos dos mediadores (CCL4, CXCL10, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-1Ra, IL-9) e aumento no nível de PDGF. De maneira semelhante, em 21-30^{Anos} foi observado redução de IL-2 e IL-7 concomitante ao aumento de IL-15, IL-1Ra e IL-5. De maneira contrária, em 31-40^{Anos} é observado início de regulação positiva em diversos marcadores séricos solúveis (VEGF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-13), seguido do aumento em CCL3 e IL-1 β em 41-50^{Anos}. Em 51-60^{Anos} um amplo aumento nos valores séricos dos marcadores é observado a partir do aumento da

concentração de CCL11, CXCL8, CCL2, FGF-básico, VEGF, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-13. Em 61-70^{Anos} apresenta aumento adicional no nível de CCL5 e IL-17, e também redução de GM-CSF. Por fim, >70^{Anos} é marcado pela redução uma série de marcadores solúveis (CXCL8, CCL2, CCL5, IL-12, IFN- γ , IL-1Ra, IL-9). Os níveis de G-CSF permanecem sem alterações durante todo o envelhecimento saudável (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Assim, pode-se observar uma onda bimodal de alterações durante o envelhecimento. Caracterizada por um pico por volta de 6-10^{Anos} e outro de 51-60^{Anos} a 61-70^{Anos}, que é seguido de grande declínio a partir de >70^{Anos}.

Figura 5 - Linha do Tempo Cinética de Quimiocinas Séricas Durante o Envelhecimento Saudável

O perfil de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=19; 6-10^{Anos}, n=35; 11-20^{Anos}, n=43; 21-30^{Anos}, n=70; 31-40^{Anos}, n=75; 41-50^{Anos}, n=95; 51-60^{Anos}, n=94; 61-70^{Anos}, n=73 e >70^{Anos}, n=37) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de dispersão dos dados (pg/mL) na escala log sobre barras dos valores de média de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas (p<0,05) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

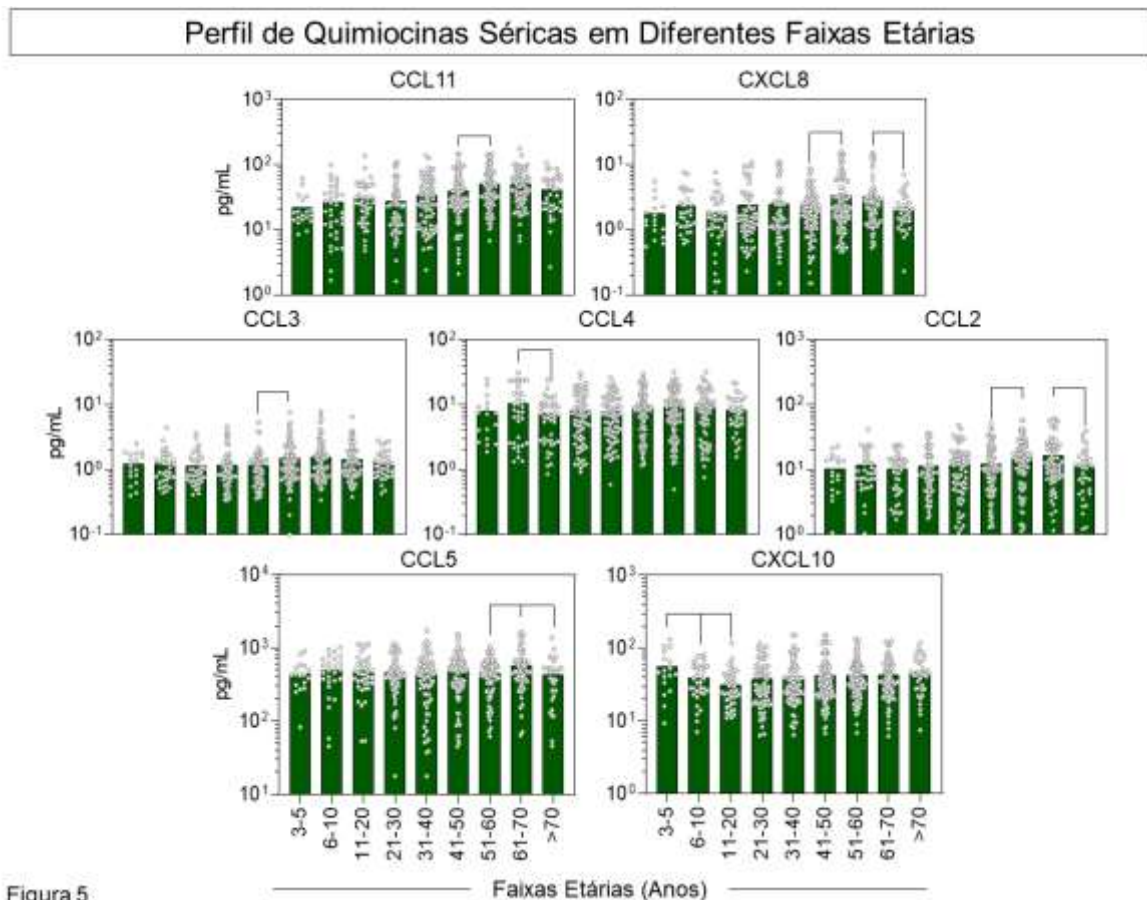


Figura 5

Fonte: Do autor

Figura 6 - Linha do Tempo Cinética de Fatores de Crescimento Durante o Envelhecimento Saudável O perfil de fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=19; 6-10^{Anos}, n=35; 11-20^{Anos}, n=43; 21-30^{Anos}, n=70; 31-40^{Anos}, n=75; 41-50^{Anos}, n=95; 51-60^{Anos}, n=94; 61-70^{Anos}, n=73 e >70^{Anos}, n=37) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de dispersão dos dados (pg/mL) na escala log sobre barras dos valores de média de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas (p<0,05) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

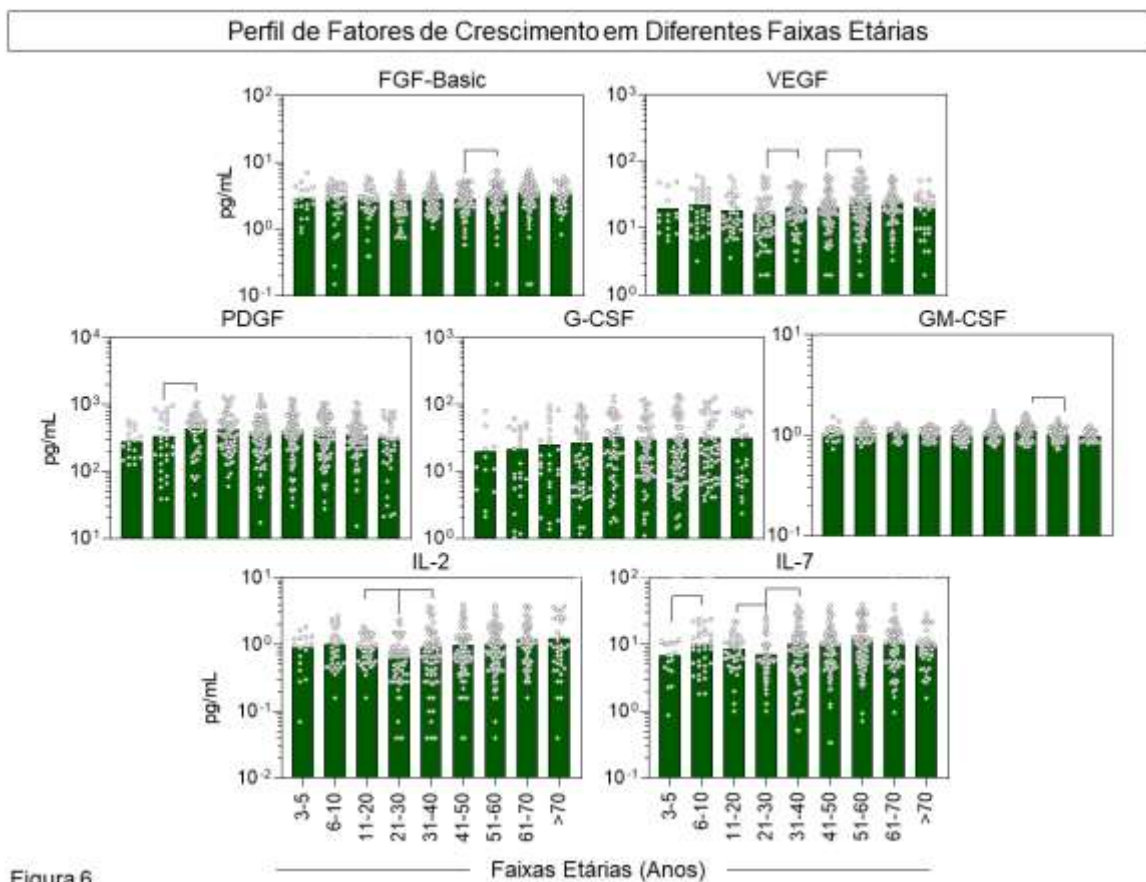


Figura 6

Fonte: Do autor

Figura 7 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Pró-Inflamatórias Durante o Envelhecimento Saudável O perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=19; 6-10^{Anos}, n=35; 11-20^{Anos}, n=43; 21-30^{Anos}, n=70; 31-40^{Anos}, n=75; 41-50^{Anos}, n=95; 51-60^{Anos}, n=94; 61-70^{Anos}, n=73 e >70^{Anos}, n=37) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de dispersão dos dados (pg/mL) na escala log sobre barras dos valores de média de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas (p<0,05) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

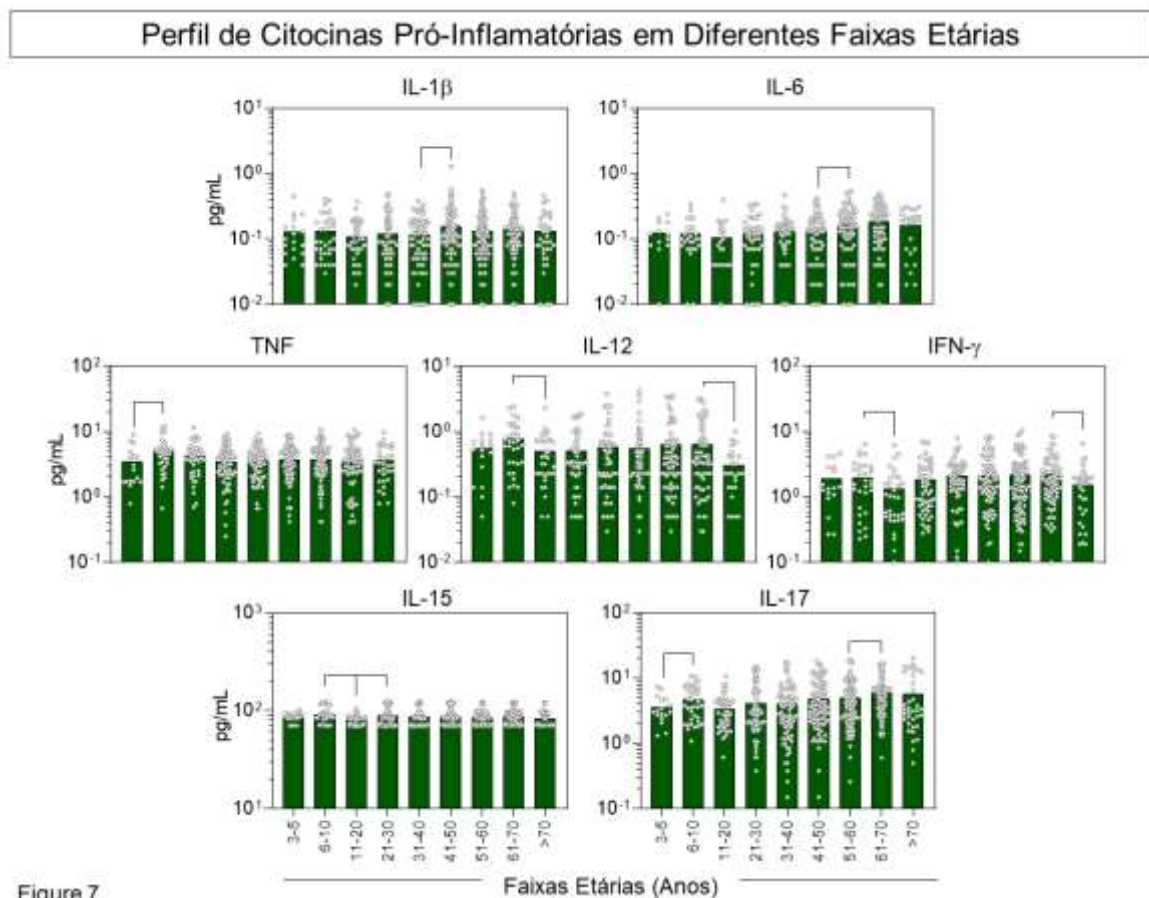


Figure 7

Fonte: Do autor

Figura 8 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Reguladoras Durante o Envelhecimento Saudável

O perfil de citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=19; 6-10^{Anos}, n=35; 11-20^{Anos}, n=43; 21-30^{Anos}, n=70; 31-40^{Anos}, n=75; 41-50^{Anos}, n=95; 51-60^{Anos}, n=94; 61-70^{Anos}, n=73 e >70^{Anos}, n=37) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados em gráficos de dispersão dos dados (pg/mL) na escala log sobre barras dos valores de média de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

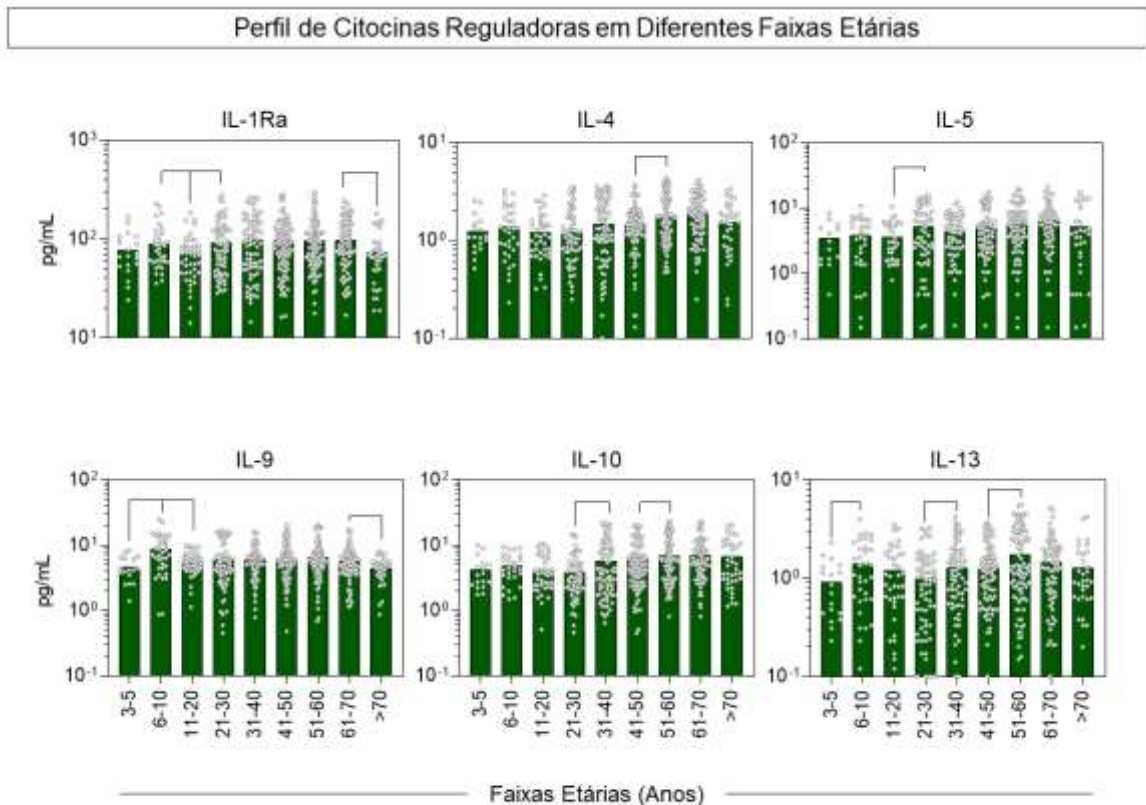


Figura 8

Fonte: Do autor

5.2 Linha do Tempo Cinética dos Marcadores Séricos Solúveis de Acordo com o Sexo

Para uma caracterização mais profunda do perfil cinético dos marcadores solúveis, os indivíduos foram subgrupados de acordo com o sexo. Assim, os níveis séricos de quimiocinas (figura 9), fatores de crescimento (figura 10), citocinas pró-inflamatórias (figura 11) e reguladoras (figura 12) foram mensurados em Homens e Mulheres e os valores comparados entre as faixas etárias adjacentes. Os resultados mostraram que em 6-10^{Anos} ocorre uma regulação positiva em homens de diversos marcadores solúveis (CCL4, FGF-básico, VEGF, IL-7, IFN- γ , IL-4, IL-9, IL-10, IL-13) o que representa uma primeira onda de mudanças. No grupo de mulheres, essa primeira onda é mais discreta (aumento de CCL5 e IL-9 e redução de CXCL10). De maneira contrária, em 11-20^{Anos} é observado em homens uma redução na concentração sérica de uma série de marcadores solúveis (CCL4, VEGF, IL-2, IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-10 e aumento de PDGF), o que representa um vale no perfil dos mediadores séricos solúveis. Nas mulheres as mudanças são mais discretas em 11-20^{Anos} redução nos níveis de CCL5, CXCL10, IL-9 e aumento de IL-5). Em 21-30^{Anos} grandes mudanças são observadas tanto em homens quanto em mulheres, no entanto os grupos apresentam perfis distintos. Em homens observa-se o início de uma segunda onda (aumento de CCL4, G-CSF, IL-6, IL-15, IL-1Ra, IL-5 e redução de CCL3, CCL5), nas mulheres observa-se a formação de um vale no perfil dos mediadores séricos solúveis (redução de CCL4, FGF-básico, VEGF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-13). Em 31-40^{Anos} os dados mostraram mais mudanças em homens (aumento de CCL11, CCL3, IL-2, IFN- γ , IL-17, IL-13) do que em mulheres (aumento de VEGF e IL-7). De maneira inversa, em 41-50^{Anos} as mudanças são predominantes no grupo de mulheres (aumento de CCL11, CCL3, GM-CSF, IL-2, TNF, IL-17, IL-4 e IL-10) em relação aos homens (aumento de IL-7 e redução de CXCL10). Em 51-60^{Anos}, aumentos adicionais são observados em ambos os grupos, sendo em homens aumento de CCL2 e CXCL10, e em mulheres aumento de CCL11, CXCL8 e CCL2. De maneira similar, em 61-70^{Anos} uma regulação positiva é observada em homens (aumento de IL-5 e redução de PDGF) e mulheres (aumento de CCL5). Tardamente, em >70^{Anos} mudanças notáveis são observadas no grupo de mulheres (redução de CXCL8, CCL3, VEGF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9) enquanto nos homens as mudanças são mais discretas (redução de CCL2, IL-2). De uma maneira geral, as concentrações de CXCL8, GM-CSF, TNF e IL-12 em homens e PDGF, G-CSF, IL-6 e IL-12 em mulheres permanecem sem alterações durante o envelhecimento saudável (Figura 9, 10, 11 e 12).

Figura 9 - Linha do Tempo Cinética de Quimiocinas Séricas Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo O perfil de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ = 230 e mulheres, ■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7, n=12; 6-10^{Anos}, n=23, n=12; 11-20^{Anos}, n=22, n=21; 21-30^{Anos}, n=31, n=39; 31-40^{Anos}, n=24, n=51; 41-50^{Anos}, n=34, n=61; 51-60^{Anos}, n=41, n=53; 61-70^{Anos}, n=27, n=46 e >70^{Anos}, n=21, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados na forma de gráfico de barras (pg/mL) na escala linear dos valores de mediana de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas (p<0,05) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

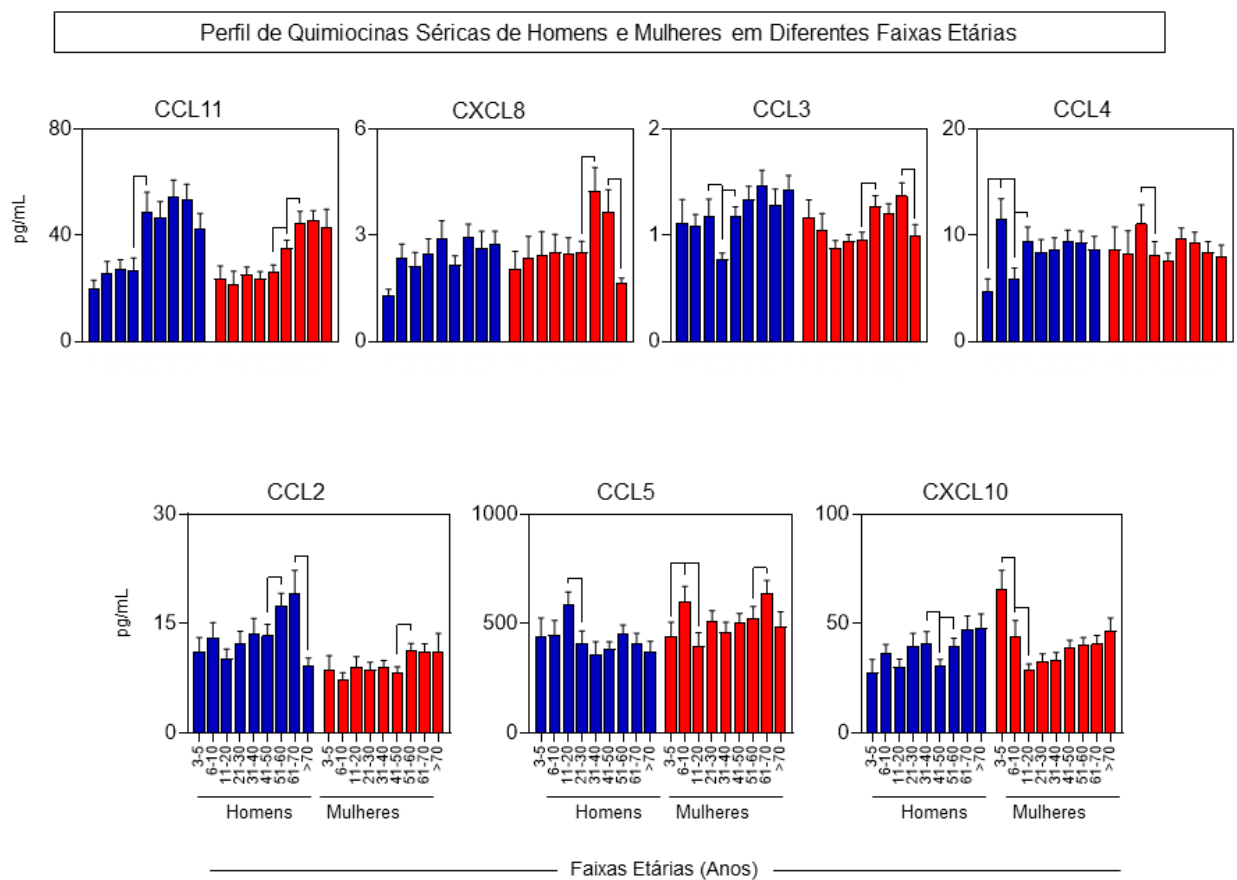


Figura 9

Fonte: Do autor

Figura 10 - Linha do Tempo Cinética de Fatores de Crescimento Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo O perfil de fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ = 230 e mulheres, ■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7, n=12; 6-10^{Anos}, n=23, n=12; 11-20^{Anos}, n=22, n=21; 21-30^{Anos}, n=31, n=39; 31-40^{Anos}, n=24, n=51; 41-50^{Anos}, n=34, n=61; 51-60^{Anos}, n=41, n=53; 61-70^{Anos}, n=27, n=46 e >70^{Anos}, n=21, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados na forma de gráfico de barras (pg/mL) na escala linear dos valores de mediana de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

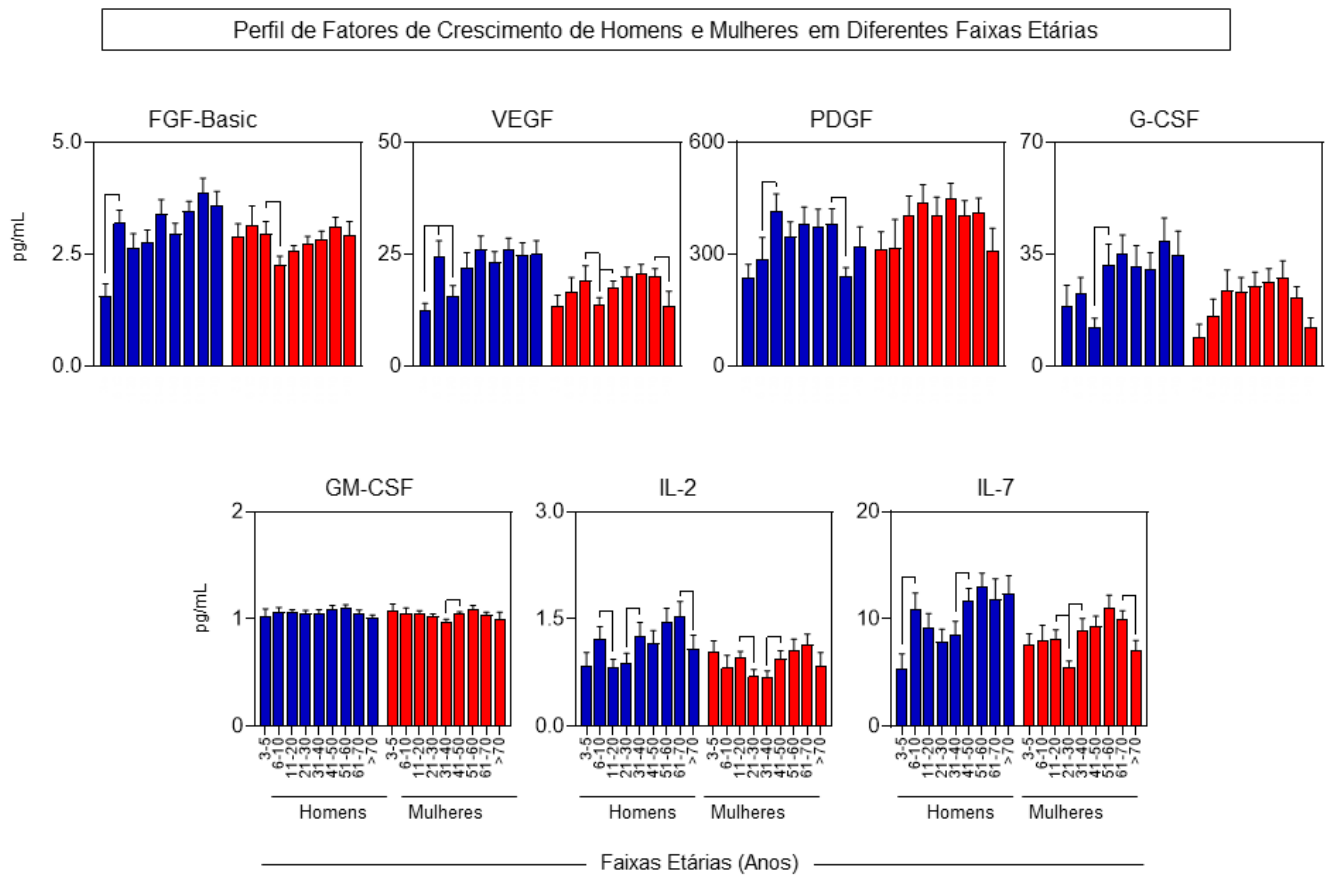


Figura 10

Fonte: Do autor

Figura 11 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Pró-Inflamatórias Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo O perfil de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ = 230 e mulheres, ■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7, n=12; 6-10^{Anos}, n=23, n=12; 11-20^{Anos}, n=22, n=21; 21-30^{Anos}, n=31, n=39; 31-40^{Anos}, n=24, n=51; 41-50^{Anos}, n=34, n=61; 51-60^{Anos}, n=41, n=53; 61-70^{Anos}, n=27, n=46 e >70^{Anos}, n=21, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados na forma de gráfico de barras (pg/mL) na escala linear dos valores de mediana de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

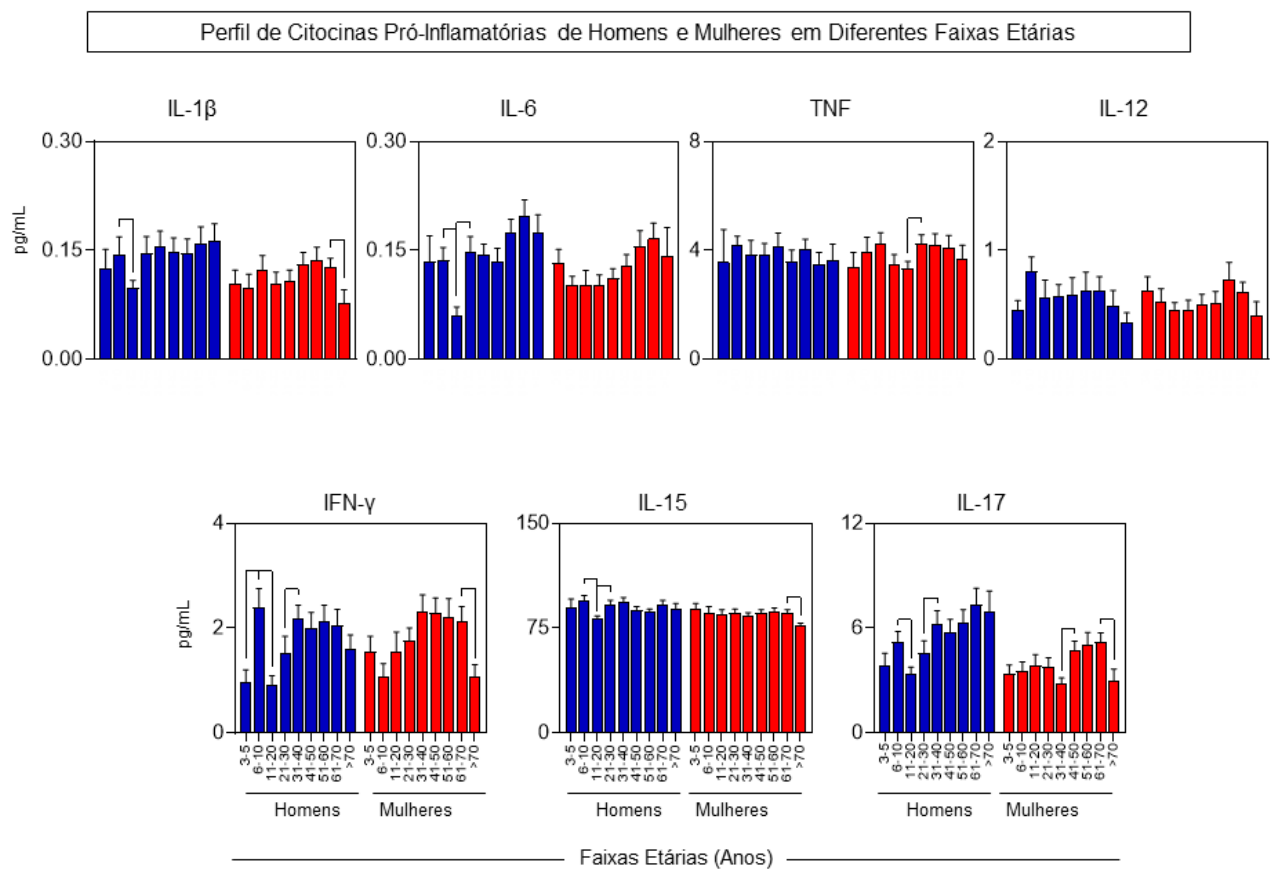


Figura 11

Fonte: Do autor

Figura 12 - Linha do Tempo Cinética de Citocinas Reguladoras Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo O perfil de citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ = 230 e mulheres, ■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7, n=12; 6-10^{Anos}, n=23, n=12; 11-20^{Anos}, n=22, n=21; 21-30^{Anos}, n=31, n=39; 31-40^{Anos}, n=24, n=51; 41-50^{Anos}, n=34, n=61; 51-60^{Anos}, n=41, n=53; 61-70^{Anos}, n=27, n=46 e >70^{Anos}, n=21, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os resultados são apresentados na forma de gráfico de barras (pg/mL) na escala linear dos valores de mediana de cada faixa etária. Análises comparativas entre faixas etárias adjacentes foram realizadas ou por teste-t de Student ou Mann-Whitney, de acordo com a normalidade da distribuição dos dados. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram destacadas por linhas para comparações entre faixas etárias adjacentes.

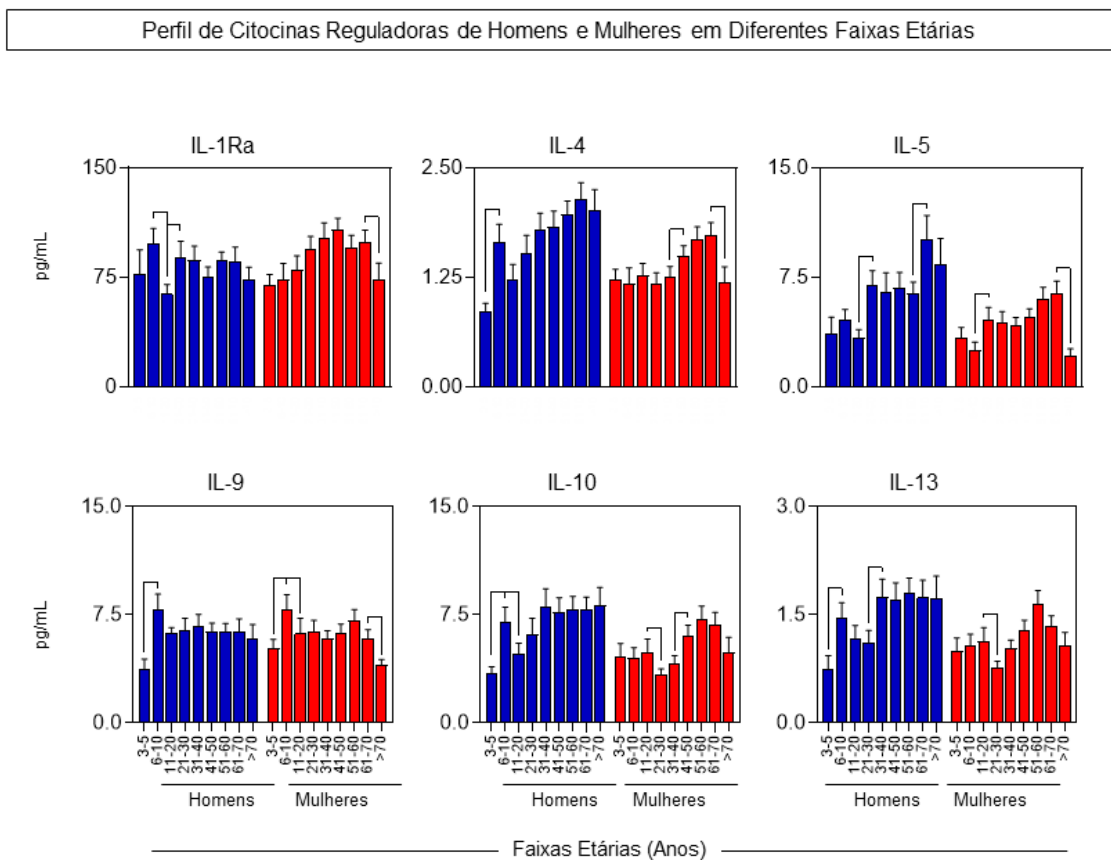


Figure 12

Fonte: Do autor

5.3 Análise de Heatmaps dos Marcadores Séricos Solúveis de Acordo com as Faixas Etárias e Sexo

Para uma visão geral do ritmo da concentração sérica dos marcadores solúveis gráfico heatmaps foi construído para toda população de estudo e posteriormente, para cada sexo (Figura 13A). Uma análise dos dados permitiu a percepção de um perfil bimodal ao longo do envelhecimento saudável. Em 6-10^{Anos} é possível observar um primeiro pico (que se inicia em 3-5^{Anos} e tem seu declínio por volta de 21-30^{Anos}), e um segundo pico pode ser observado em 61-70^{Anos} (iniciando em 31-40^{Anos} e com declínio depois de 70 anos). Além disso, mais marcadores séricos solúveis compõem o segundo pico. O padrão observado em homens é similar. Entretanto, as diferenças estão no vale mais suave que ocorre em 21-30^{Anos} e o maior número de marcadores séricos solúveis ao início do segundo pico, que ocorre em 31-40^{Anos}. Diferentemente, nas mulheres o perfil observado é trimodal, com o primeiro pico ocorrendo em 3-5^{Anos}, um pico intermediário em 11-20^{Anos} e o terceiro pico em 61-70^{Anos}. Ainda, de uma maneira geral os dados demonstram que em todos os grupos ocorre redução na concentração sérica dos mediadores solúveis por volta de 21-30^{Anos} e uma segunda redução tardia, que ocorre após >70^{Anos} (Figura 13A).

Figura 13 – Heatmaps e Assinaturas de Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável (A) Heatmaps foram construídos com objetivo de definir o padrão de secreção de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ = 230 e mulheres, ■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7, n=12; 6-10^{Anos}, n=23, n=12; 11-20^{Anos}, n=22, n=21; 21-30^{Anos}, n=31, n=39; 31-40^{Anos}, n=24, n=51; 41-50^{Anos}, n=34, n=61; 51-60^{Anos}, n=41, n=53; 61-70^{Anos}, n=27, n=46 e >70^{Anos}, n=21, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. Os valores de mediana observado de cada marcador em cada faixa etária, expressos em pg/mL, foram utilizados para cálculo do escore Z, e posteriormente, utilizado para geração dos heatmaps. A escala foi estabelecida de -2 a mais dois e ilustrada em gradiente de verde (ambos os sexos), azul (homens) e vermelho (mulheres). (B) A assinatura geral de quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras dosados em amostras de soro indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e subgrupados de acordo com o sexo (homens, ■ e mulheres, ■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}; 6-10^{Anos}; 11-20^{Anos}; 21-30^{Anos}; 31-40^{Anos}; 41-50^{Anos}; 51-60^{Anos}; 61-70^{Anos} e >70^{Anos}). As assinaturas foram geradas pela conversão dos níveis séricos, inicialmente expressos em pg/mL, em uma viável categórica (proporção) utilizando o terceiro tercil global como limite. Os dados estão apresentados em gráficos de radar onde cada eixo representa um marcador. O trigésimo terceiro percentil (zona cinza) foi utilizado para ressaltar os marcadores séricos com proporção aumentada para cada faixa etária.

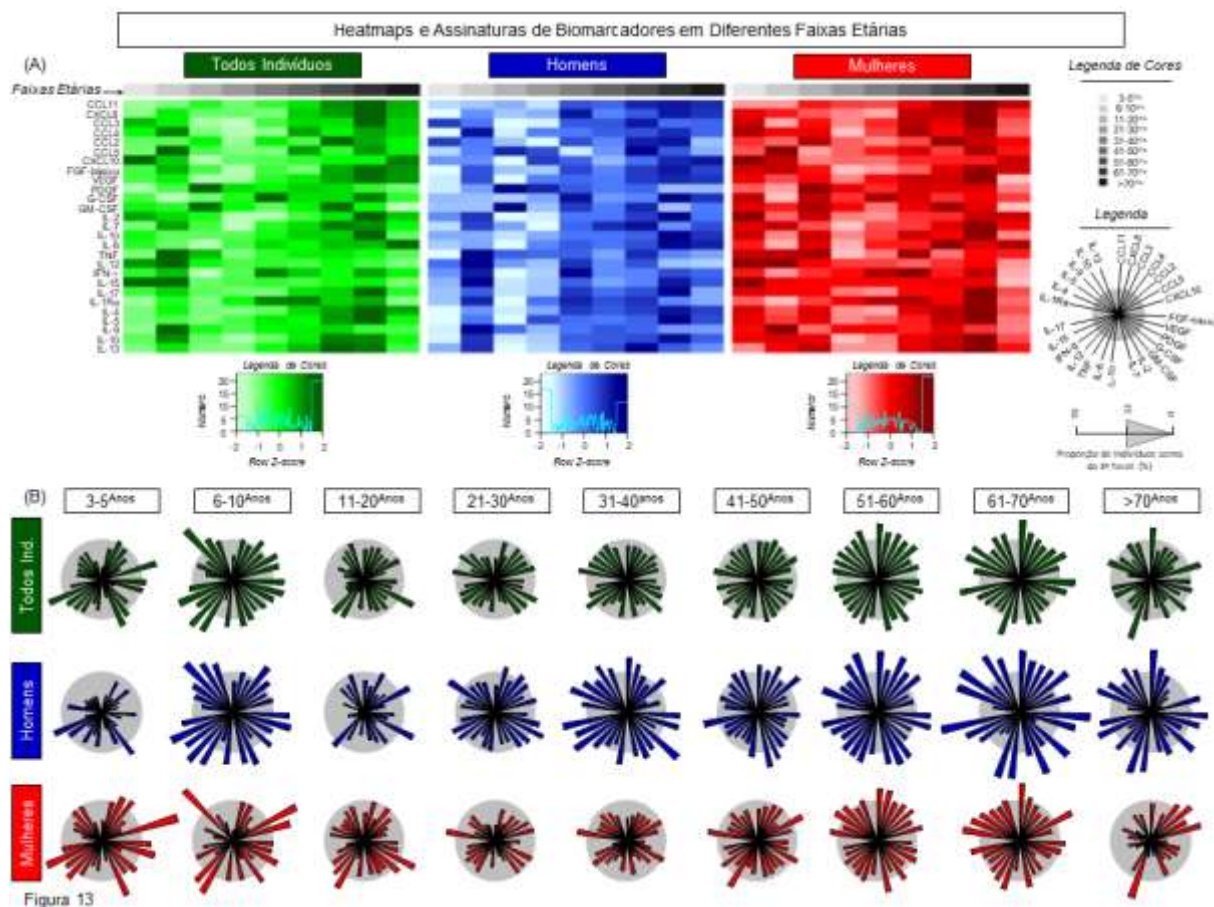


Figura 13

Fonte: Do autor

5.4 Assinaturas de Marcadores Séricos Solúveis de acordo com as Faixas Etárias e Sexo

Uma análise complementar dos marcadores séricos solúveis foi feita através da análise de assinaturas (Figura 13B). Para tal, os níveis séricos de cada marcador solúvel, antes expressas na forma de uma variável quantitativa contínua (pg/mL), foram transformados em variáveis categóricas (proporção). Como cut-off foi utilizado o terceiro tertil para estimar a porcentagem (%) dos indivíduos estavam acima desse limite estabelecido. E assim como observado nos heatmaps, um perfil bimodal de alterações nos mediadores séricos solúveis pode ser observado para a população estudada (grupo Todos Indivíduos).

Quando os indivíduos foram sub-agrupados de acordo com o sexo, as análises do grupo composto por homens apresentam uma assinatura bimodal dos marcadores séricos solúveis ao longo do envelhecimento saudável. Sendo uma clara proporção aumentada (>33%) de indivíduos com altos níveis de mediadores séricos em 6-10^{Anos} e depois uma segunda expansão no perfil iniciando mais cedo, em 31-40^{Anos} seguido de uma redução mais discreta em >70^{Anos}.

A análise das assinaturas dos marcadores séricos solúveis mostrou que o grupo composto de mulheres possui um perfil bimodal. Com uma primeira onda de expansão indo de 3-5^{Anos} para 6-10^{Anos} e uma segunda onda se iniciando em 51-60^{Anos} com um declínio proeminente em >70^{Anos} (Figura 13B).

5.5 Análise Integrativa de Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Conectividade com a Vizinhança Durante o Envelhecimento Saudável

Com o objetivo do melhor entendimento que existe entre os diferentes marcadores séricos solúveis durante o envelhecimento saudável, redes de marcadores foram construídas e a conectividade intrínseca foi analisada para cada faixa etária (Figura 14). Tanto as matrizes de correlações quanto os grafos de poder de conexão (redes) foram montados com base nos índices de correlações fortes e significantes ($r > 0,67$) durante o envelhecimento saudável. Para tal somente os mediadores com mais de 5 conexões fortes foram considerados.

Com isso, os resultados demonstraram a maior conectividade com a vizinhança (157 conexões) em 3-5^{Anos} envolvendo 19 marcadores solúveis (CCL11, CXCL8, CCL4, FGF-básico, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-1 β , IL-6, TNF, IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). Em 6-10^{Anos} ocorre um declínio no número de conexões fortes, com 87 conexões envolvendo 12 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL4, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 11-20^{Anos} ocorre um declínio mais profundo na conectividade com a vizinhança, sendo observado 48 conexões envolvendo 7 marcadores séricos solúveis (CCL11, IL-7, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 21-30^{Anos} é observado um fortalecimento da conectividade com a vizinhança, apresentando 78 conexões distribuídas em 10 marcadores (FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Nas faixas etárias seguintes é observado uma estabilidade na conectividade, sendo em 31-40^{Anos} observado 56 conexões distribuídas em 7 marcadores (FGF-básico, VEGF, IL-7, IL-15, IL-17, IL-4 e IL-10), em 41-50^{Anos} observado 46 conexões distribuídas em 7 marcadores (IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13) e em 51-60^{Anos} observado 68 conexões distribuídas em 8 marcadores (VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Após esse período, em 61-70^{Anos} é observado um declínio na conectividade com a vizinhança, apresentando 43 conexões entre 6 marcadores séricos solúveis (G-CSF, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-5 e IL-10). Em >70^{Anos} ocorre uma recuperação na conectividade, sendo observado 72 conexões distribuídas em 10 marcadores (CXCL8, FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5 e IL-10) (Figura 14).

Figura 14 – Matrizes de Correlações e Redes de Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável Matrizes de correlações foram montadas com base nos valores de “r” de Pearson e Spearman entre quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) foi dosado em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=19; 6-10^{Anos}, n=35; 11-20^{Anos}, n=43; 21-30^{Anos}, n=70; 31-40^{Anos}, n=75; 41-50^{Anos}, n=95; 51-60^{Anos}, n=94; 61-70^{Anos}, n=73 e >70^{Anos}, n=37) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. As visões panorâmicas das correlações são apresentadas na forma de uma matriz triangular no qual cada intersecção representa o valor da correlação entre os atributos. O valor de “r” que eram estatísticos ($p < 0,05$) são representados por círculos com tamanhos proporcionais, na escala de -1 a +1 em um gradiente de cor verde. Quadrados brancos representam correlações não significativas. As redes foram construídas considerando todas correlações significativas, com os nós representando quimiocinas (círculos; 1=CCL11; 2=CXCL8; 3=CCL3; 4=CCL4; 5=CCL2, 6=CCL5 e 7=CXCL10), fatores de crescimento (losango; 8=FGF-básico; 9=PDGF; 10=VEGF; 11=G-CSF; 12=GM-CSF; 13=IL-2 e 14=IL-7), citocinas pró-inflamatórias (quadrados; 15=IL-1 β ; 16=IL-6; 17=TNF; 18=IL-12; 19=IFN- γ ; 20=IL-15 e 21=IL-17), e citocinas reguladoras (hexágonos; 22=IL-1Ra; 23=IL-4; 24=IL-5; 25=IL-9; 26=IL-10 e 27=IL-13). Linhas conectoras ilustram valores de “r” fraco/moderado (0.1 a 0.67, linhas finas) e fortes (≥ 0.67 , linhas grossas) entre pares de marcadores. Marcadores com conectividade envolvendo a o menos 5 conexões fortes são ressaltados com símbolos escuros (●, ◆, ■ e ◈) e suas conexões são ressaltadas por uma linha verdes. O número de marcadores envolvidos na vizinhança selecionada (contagem) e a conectividade entre a vizinhança foram fornecidos para cada faixa etária.

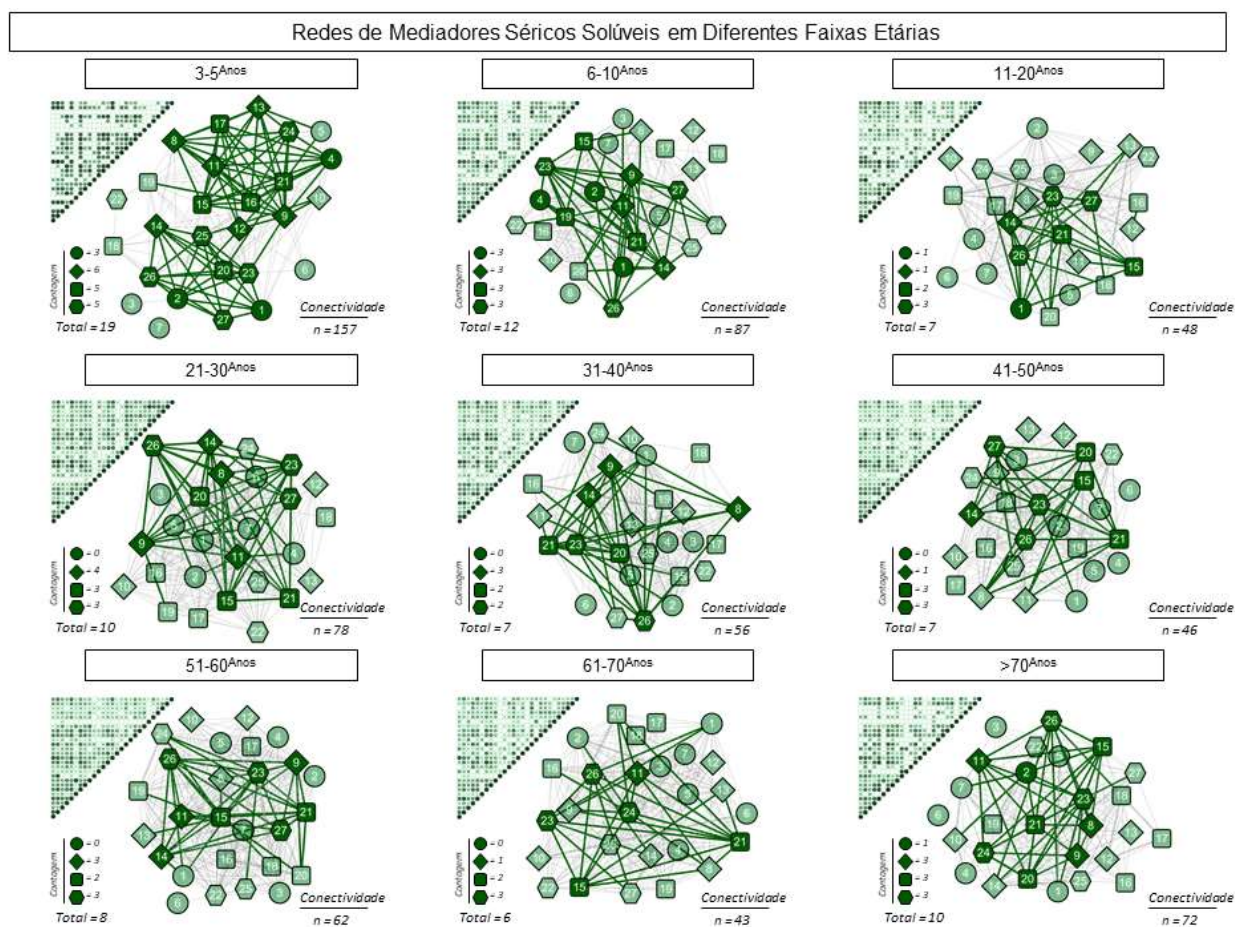


Figura 14

Fonte: Do autor

5.6 Análise Integrativa de Redes de Marcadores Séricos Solúveis e Conectividade com a Vizinhança Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

Para um entendimento mais profundo das diferenças entre os sexos no relacionamento entre marcadores séricos solúveis, redes de biomarcadores foram construídas para homens (Figura 15) e mulheres saudáveis (Figura 16) de acordo com as faixas. Assim, grafos de poder de conexão (redes) foram montados com base nos índices de correlações fortes e significantes ($r > 0,67$) durante o envelhecimento saudável. Logo, somente os mediadores com mais de 5 conexões fortes foram considerados.

Os resultados demonstraram que em homens a maior conectividade com a vizinhança ocorre em 3-5^{anos} (192 conexões distribuídas entre 19 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL4, CXCL10, FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). Em 6-10^{anos}, ocorre um declínio no número de conexões fortes (90

conexões distribuídas entre 12 marcadores (CXCL8, CCL4, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 11-20^{Anos} a conectividade continua em queda, apresentando 60 conexões distribuídas em 9 marcadores (CCL11, FGF-básico, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 21-30^{Anos} é observado uma recuperação nos valores de conectividade, assim apresenta 192 conexões distribuídas em 17 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL4, CCL2, CXCL10, FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13). Nas faixas etárias seguintes são observadas poucas variações na conectividade com a vizinhança, assim em 31-40^{Anos} apresenta 97 conexões distribuídas em 12 marcadores (FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), e em 41-40^{Anos} é observado 80 conexões distribuídas em 12 marcadores (CXCL8, CXCL10, FGF-básico, VEGF, IL-7, IL-1 β , IL-12, IL-15, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 51-60^{Anos} é perceptível o declínio no valor de conexões com a vizinhança, sendo observado 20 conexões distribuídas em 3 marcadores (IL-17, IL-4 e IL-10). Na faixa etária seguinte ocorre uma recuperação relevante, assim em 61-70^{Anos} observa-se 122 conexões distribuídas em 16 marcadores (CXCL8, CCL4, CCL5, FGF-básico, G-CSF, IL-7, IL-1 β , TNF, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13), seguido de um pequeno declínio em >70^{Anos}, apresentando 90 conexões distribuídas em 12 mediadores (CXCL8, CXCL10, FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-9 e IL-10) (Figura 15).

Figura 15 – Redes de Marcadores Séricos Solúveis em Homens Durante o Envelhecimento Saudável Redes de correlações foram montadas com base nos valores de “r” de Pearson e Spearman entre quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, subgrupados de acordo com o sexo (■ = 230), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=7; 6-10^{Anos}, n=23; 11-20^{Anos}, n=22; 21-30^{Anos}, n=31; 31-40^{Anos}, n=24; 41-50^{Anos}, n=34, 51-60^{Anos}, n=41, 61-70^{Anos}, n=27 e >70^{Anos}, n=21) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. As redes foram construídas considerando todas correlações significativas, com os nós representando quimiocinas (círculos; 1=CCL11; 2=CXCL8; 3=CCL3; 4=CCL4; 5=CCL2, 6=CCL5 e 7=CXCL10), fatores de crescimento (losango; 8=FGF-básico; 9=PDGF; 10=VEGF; 11=G-CSF; 12=GM-CSF; 13=IL-2 e 14=IL-7), citocinas pró-inflamatórias (quadrados; 15=IL-1 β ; 16=IL-6; 17=TNF; 18=IL-12; 19=IFN- γ ; 20=IL-15 e 21=IL-17), e citocinas reguladoras (hexágonos; 22=IL-1Ra; 23=IL-4; 24=IL-5; 25=IL-9; 26=IL-10 and 27=IL-13). Linhas conectoras ilustram valores de “r” fraco/moderado (0.1 a 0.67, linhas finas) e fortes (≥ 0.67 , linhas grossas) entre pares de marcadores. Marcadores com conectividade envolvendo ao menos 5 conexões fortes são ressaltados com símbolos escuros (●, ◆, ■ e ◆) e suas conexões são ressaltadas por uma linha azuis. O número de marcadores envolvidos na vizinhança selecionada (contagem) e a conectividade entre a vizinhança foram fornecidos para cada faixa etária.

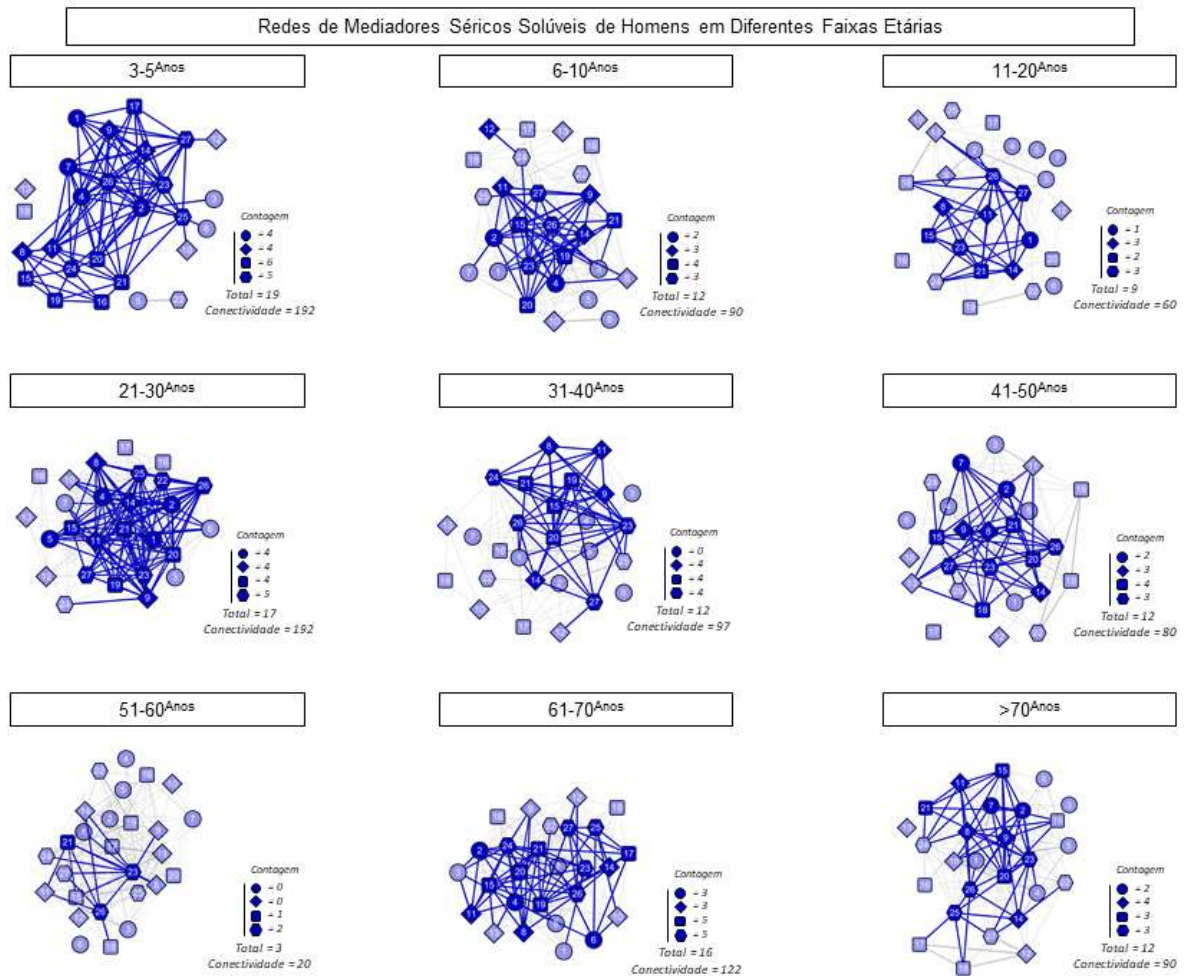


Figura 15

Fonte: Do autor

No grupo composto por mulheres a maior conectividade também é observada em 3-5^{Anos}, sendo 224 conexões distribuídas em 21 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL4, CCL2, CXCL10, FGF-básico, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-1 β , IL-6, TNF, IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). A conectividade com a vizinhança apresenta uma queda em 6-10^{Anos}, apresentando 133 conexões distribuídas 16 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL4, CCL5, FGF-básico, VEGF, PDGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13) e logo após tem-se uma pequena recuperação em 11-20^{Anos}, sendo observado 152 conexões distribuídas em 15 marcadores (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CXCL10, FGF-básico, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-9, IL-10 e IL-13). Em seguida o valor de conectividade com a vizinhança apresenta um declínio, no qual observa-se em 21-30^{Anos} 81 conexões distribuídas em 12 marcadores (CXCL8, CCL4, CXCL10, FGF-básico, VEGF, PDGF, IL-7, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), e em 31-40^{Anos} a conectividade com a

vizinhança apresenta seu menor valor, sendo 32 conexões distribuídas em 5 marcadores (IL-7, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 41-50^{Anos} é observado 68 conexões distribuídas em 9 marcadores (VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-10 e IL-13). Em 51-60^{Anos} o valor de conectividade volta a subir, apresentando 148 conexões distribuídas em 15 marcadores (CCL11, CXCL8, FGF-básico, VEGF, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IFN- γ , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13). Em 61-70^{Anos} a conectividade com a vizinhança cai, onde observa-se 63 conexões distribuídas em 9 mediadores (CXCL8, CCL3, G-CSF, IL-7, IL-1 β , IL-17, IL-4, IL-5 e IL-10). Em >70^{Anos} ocorre uma recuperação na conectividade, apresentando 151 conexões distribuídas em 17 marcadores (: CCL11, CXCL8, CCL2, FGF-básico, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-1 β , IL-15, IL-17, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13) (Figura 16).

Figura 16 – Redes de Marcadores Séricos Solúveis em Mulheres Durante o Envelhecimento Saudável Redes de correlações foram montadas com base nos valores de “r” de Pearson e Spearman entre quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, subgrupados de acordo com o sexo (■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos}, n=12; 6-10^{Anos}, n=12; 11-20^{Anos}, n=21; 21-30^{Anos}, n=39; 31-40^{Anos}, n=51; 41-50^{Anos}, n=61; 51-60^{Anos}, n=53; 61-70^{Anos}, n=46 e >70^{Anos}, n=16) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. As redes foram construídas considerando todas correlações significativas, com os nós representando quimiocinas (círculos; 1=CCL11; 2=CXCL8; 3=CCL3; 4=CCL4; 5=CCL2, 6=CCL5 e 7=CXCL10), fatores de crescimento (losango; 8=FGF-básico; 9=PDGF; 10=VEGF; 11=G-CSF; 12=GM-CSF; 13=IL-2 e 14=IL-7), citocinas pró-inflamatórias (quadrados; 15=IL-1 β ; 16=IL-6; 17=TNF; 18=IL-12; 19=IFN- γ ; 20=IL-15 e 21=IL-17), e citocinas reguladoras (hexágonos; 22=IL-1Ra; 23=IL-4; 24=IL-5; 25=IL-9; 26=IL-10 and 27=IL-13). Linhas conectoras ilustram valores de “r” fraco/moderado (0.1 a 0.67, linhas finas) e fortes (\geq 0.67, linhas grossas) entre pares de marcadores. Marcadores com conectividade envolvendo ao menos 5 conexões fortes são ressaltados com símbolos escuros (●, ◆, ■ e ◈) e suas conexões são ressaltadas por uma linha vermelhas. O número de marcadores envolvidos na vizinhança selecionada (contagem) e a conectividade entre a vizinhança foram fornecidos para cada faixa etária.

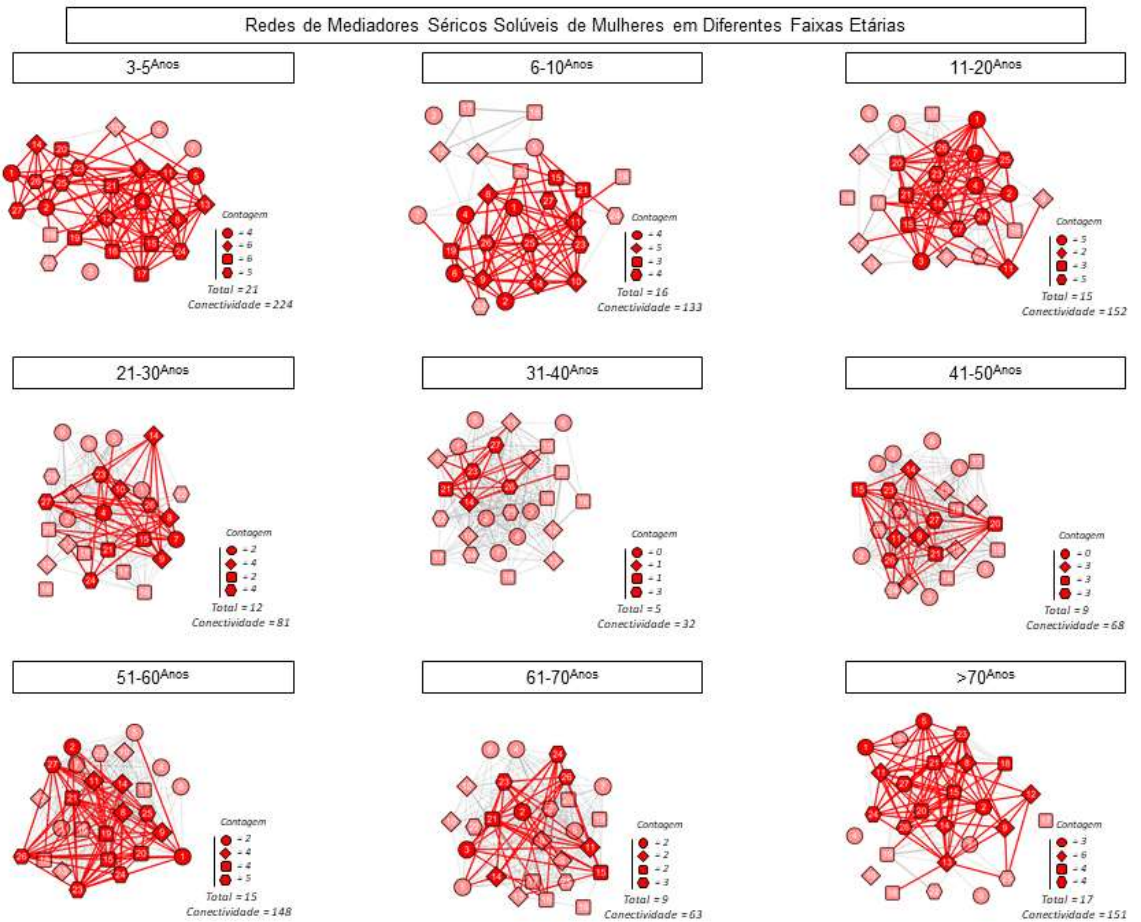


Figura 16

Fonte: Do autor

Em uma perspectiva generalizada, nota-se que há um perfil dinâmico distinto entre as redes de ambos os sexos. E assim destaca-se que rearranjos de recuperação ocorrem mais cedo e com mais frequência nas mulheres (observados em 11-20^{Anos}, 51-60^{Anos} e >70^{Anos}) em relação aos homens (no qual ocorre em 21-30^{Anos} e 61-70^{Anos}).

5.7 Uma Visão Global dos Ritmos dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável de Acordo com o Sexo

As concentrações séricas reguladas positivamente de quimiocinas, fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e reguladoras foram resumidas e agrupadas para se ter uma visão total das mudanças nos marcadores séricos solúveis em diferentes faixas etárias para toda população de estudo (Figura 17), para homens (Figura 18) e mulheres saudáveis (Figura 19). A visão panorâmica foi viabilizada considerando as mudanças em relação ao valor de mediana dos marcadores séricos solúveis em diferentes faixas etárias expressas em aumentos relativos (>1) a mediana global correspondente a todas as faixas etárias em conjunto. Para cada

faixa etária, o grupo de marcadores séricos solúveis foram dispostos em ordem ascendente de valores relativos a mediana.

Os resultados corroboraram com um claro perfil bimodal de ondas de marcadores séricos solúveis durante o envelhecimento saudável com picos em 6-10^{Anos} e em 61-70^{Anos} (Figura 17). Quando se avalia os sexos separadamente, os ritmos de homens e mulheres mostram características particulares. Em homens, o perfil é composto de duas ondas de marcadores séricos solúveis, sendo um pulso em 6-10^{Anos} e outro que abrange de 21-40^{Anos} com um reforço em 51-60^{Anos}, sendo seguido de um declínio suave em >70^{Anos} (Figura 18). Já no grupo de mulheres, as duas ondas exibem ritmos que se caracterizam por dois pulsos mais largos, sendo o primeiro se estendendo de 3-10^{Anos} e o segundo pulso ocorrendo por volta de 41-50^{Anos} sendo seguido de forte declínio em >70^{Anos} (Figura 19).

Figura 17 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável A regulação aumentada nos níveis de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7), citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, TNF, IL-12, IFN- γ , IL-15, IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos (■), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos} = □; 6-10^{Anos} = □; 11-20^{Anos} = □; 21-30^{Anos} = □; 31-40^{Anos} = □; 41-50^{Anos} = □; 51-60^{Anos} = □; 61-70^{Anos} = □ and >70^{Anos} = □) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. A visão geral foi desenhando como um gráfico de barras e linhas para resumir as regulações positivas nos valores de mediana dos marcadores solúveis em cada faixa etária expressas em aumentos relativos (>1) em relação a mediana global. Cada marcador sérico tem sua estrutura representada em cartoon, que foi gerado pela plataforma on-line SWISS MODEL que utiliza software de modelagem-homologia de estrutura de proteica (GUEX et al., 2009; WATERHOUSE et al., 2018) com base na sequência alvo fornecida pelo Banco de Dados de Proteínas (BERMAN et al., 2003). O conjunto de marcadores séricos solúveis que apresentam níveis elevados tem seus valores expressos.

Compilado de Alterações de Mediadores Séricos Solúveis em Diferentes Faixas Etárias

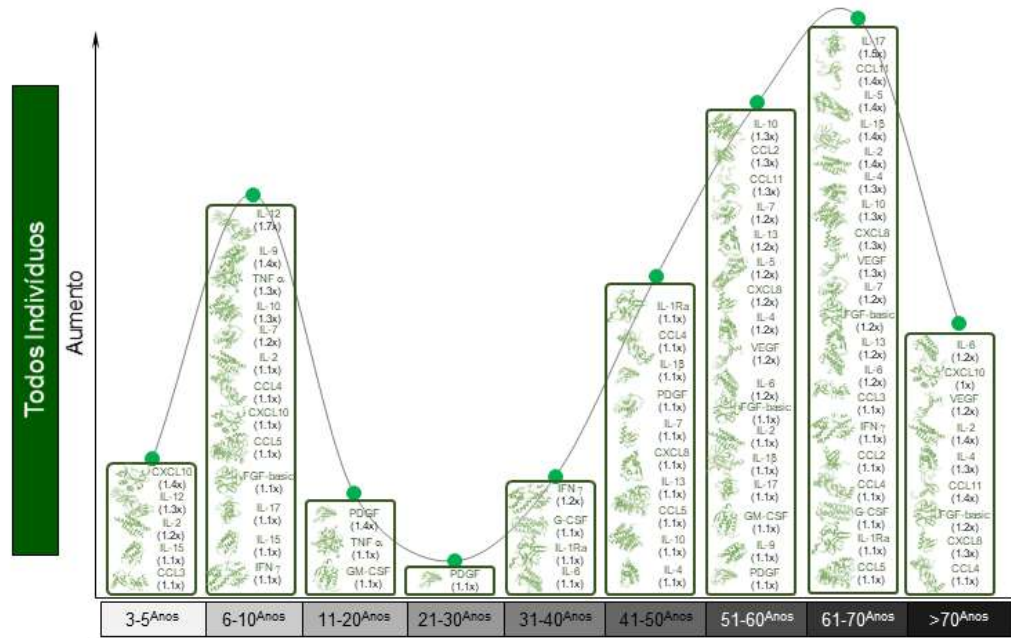


Figura 17

Fonte: Do autor

Figura 18 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis em Homens Durante o Envelhecimento Saudável A regulação aumentada nos níveis de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7), citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-γ, IL-15, IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, subgrupados de acordo com o sexo (■ = 230), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos} = □; 6-10^{Anos} = □; 11-20^{Anos} = □; 21-30^{Anos} = □; 31-40^{Anos} = □; 41-50^{Anos} = □; 51-60^{Anos} = □; 61-70^{Anos} = □ and >70^{Anos} = □) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. A visão geral foi desenhando como um gráfico de barras e linhas para resumir as regulações positivas nos valores de mediana dos

marcadores solúveis em cada faixa etária expressas em aumentos relativos (>1) em relação a mediana global. O conjunto de marcadores séricos solúveis que apresentam níveis elevados tem seus valores expressos.

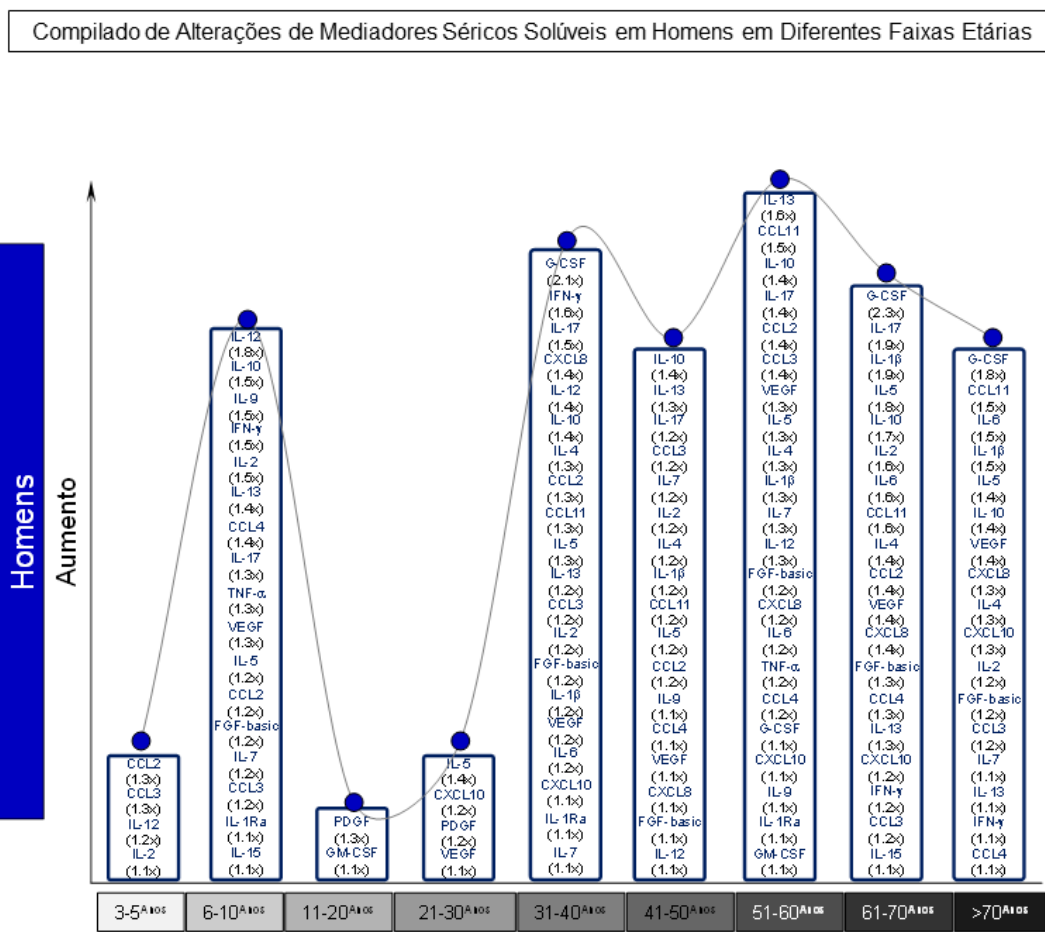


Figura 18

Fonte: Do autor

Figura 19 – Visão Global do Ritmo dos Marcadores Séricos Solúveis em Mulheres Durante o Envelhecimento Saudável A regulação aumentada nos níveis de quimiocinas (CCL11, CXCL8, CCL3, CCL4, CCL2, CCL5, CXCL10), fatores de crescimento (FGF-básico, PDGF, VEGF, G-CSF, GM-CSF, IL-2 e IL-7), citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-6, TNF, IL-12, IFN-γ, IL-15, IL-17) e citocinas reguladoras (IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) dosados em amostras de soro de 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, subgrupados de acordo com o sexo (■ = 311), e categorizados em faixas etárias distintas (3-5^{Anos} = □; 6-10^{Anos} = □; 11-20^{Anos} = □; 21-30^{Anos} = □; 31-40^{Anos} = □; 41-50^{Anos} = □; 51-60^{Anos} = □; 61-70^{Anos} = □ and >70^{Anos} = □) através da plataforma Luminex Bio-plex como descrito nos Materiais e Métodos. A visão geral foi

desenhando como um gráfico de barras e linhas para resumir as regulações positivas nos valores de mediana dos O conjunto de marcadores séricos solúveis que apresentam níveis elevados tem seus valores expressos.

Compilado de Alterações de Mediadores Séricos Solúveis em Mulheres em Diferentes Faixas Etárias

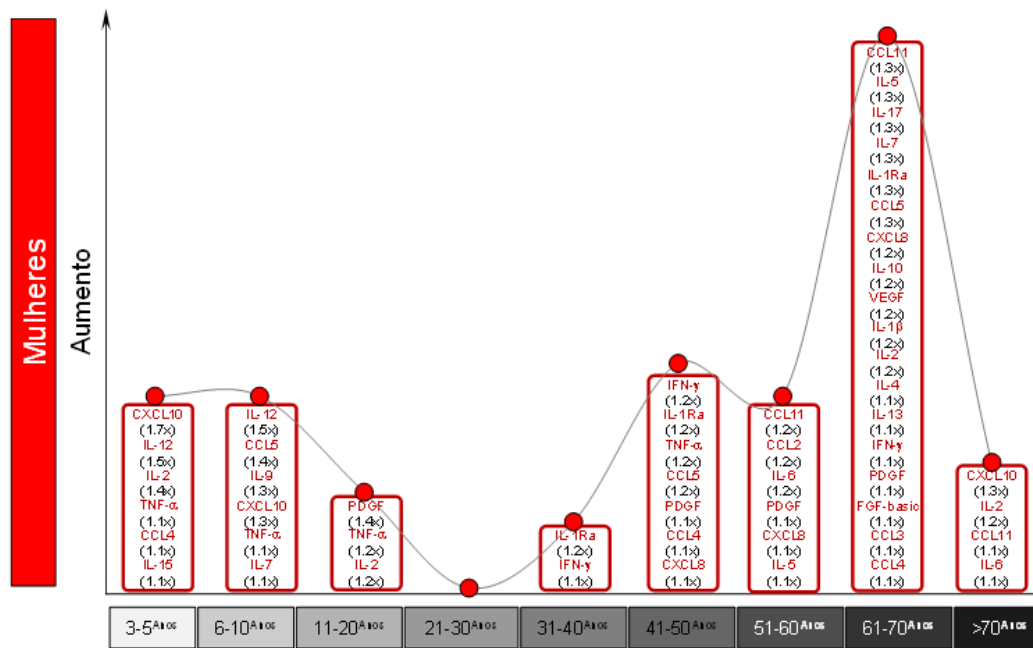


Figura 19

Fonte: Do autor

6. Discussão

O processo de envelhecimento envolve diversos mecanismos celulares e moleculares, sendo caracterizado como um fenômeno multifatorial, que desencadeiam alterações funcionais no sistema imune (AKHA, S, 2018). Estudos demonstram que esse processo possui altos níveis de complexidade. E conforme o organismo envelhece, da infância até a idade adulta e posterior senescência, o sistema imune passa por mudanças profunda, de expansão, adaptação, remodelamento e por fim declínio, para prover saúde e sobrevivência (SIMON et al., 2015).

Diante desse quadro, visando contribuir para um melhor entendimento das mudanças fenotípicas imunológicas durante o envelhecimento saudável, o presente estudo foi desenhado para investigar e entender o perfil de marcadores séricos solúveis, e assim gerar evidências científicas que supram as brechas de conhecimento que ainda restam a ser elucidadas. Para tal,

o foco do estudo foi dado para a caracterização dos ritmos e a conectividade que esses marcadores possuem. Para cumprir com os objetivos propostos, os níveis séricos de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento foram dosados por microesferas de alto rendimento em soro de indivíduos saudáveis de diversas faixas etárias (3^{Anos} a >70^{Anos}), e posteriormente utilizando de diversas abordagens de uma análise integrativa e também montagem de redes.

Nossos resultados demonstram que ocorrem diferentes padrões e comportamentos distintos dos marcadores séricos solúveis durante o envelhecimento saudável. Além disso, particularidades atribuídas aos sexos diferentes culminam para mudanças e ondas com ritmos diferentes. Cinco marcadores séricos solúveis se sobressaltam como biomarcadores universais que se alteram com a idade em indivíduos saudáveis, são eles: CCL11, CXCL8, IL-1 β , IL-6 e TNF. Em geral, TNF apresentou níveis elevados nas faixas etárias iniciais. Já CCL11, CXCL8, IL-1 β e IL-6 exibiram níveis mais altos nas faixas etárias mais elevadas (após 31-40^{Anos}). Nossos achados são reforçados por estudos prévios, que também demonstraram aumento nos níveis séricos de CCL11, CXCL8 e IL-6 durante o envelhecimento saudável (TARGOWSK et al., 2005; BONFANTE et al., 2017; VALIATHAN et al., 2016; TORRES et al., 2018).

Logo, quando o envelhecimento é discutido o SASP possui um papel central, sendo considerado extremamente relevante (COPPÉ et al., 2008; GORGOULIS et al., 2019; BIRCH E GIL, 2020). O SASP é um processo dinâmico e heterogêneo que ocorre durante o envelhecimento, gerando mudanças fenotípicas profundas na composição e concentração de marcadores solúveis. Classicamente, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como CXCL8, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são marcadores relacionados ao envelhecimento, caracterizando o processo inflamatório associado ao envelhecimento denominado *inflammaging* (FRANCESCHI et al., 2007). Assim, os perfis de diversos marcadores séricos solúveis são comumente associados ao processo de envelhecimento e a ocorrência de doenças ligadas a esse processo.

A associação dos marcadores séricos solúveis com doenças ligadas ao envelhecimento é reportada em uma gama de estudos. Níveis aumentados de CCL11, CXCL8, IL-1 β , IL-6 e TNF- α são associados com a ocorrência de diversas desordens associadas ao envelhecimento. Níveis elevados de CCL11 teve associação com a ocorrência de processos neurodegenerativos, desordens neurológicas e condições patológicas associadas a idade, como por exemplo desordem bipolar, Alzheimer, doenças vasculares e esclerose múltipla (PANIZZUTTI et al.,

2015; MORGAN et al., 2019; IVANOVSKA et al., 2020, RAGHURAMAN et al., 2017; HUANG et al., 2020). Níveis aumentados de CXCL8 foram associados com osteoartrite e degeneração macular relacionada a idade (BONFANTE et al., 2017, LECHNER et al., 2017). IL-1 β também está envolvido em diversos processos patológicos associados com o envelhecimento, como comprometimento cognitivo e síndrome coronariana aguda (GORSKA-CIEBIADA et al., 2016; LEOCÁDIO et al., 2019). IL-6 tem sido associado com diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, como redução cognitiva, desenvolvimento de sarcopenia e síndrome metabólica (BIAN et al., 2017; CHARLTON et al., 2018; NEVES et al., 2019). O estudo de Lima-Costa et al., (2017) sugeriu que uma única medida de IL-6 possuía valor prognóstico para mortalidade a curto e longo termo. Além disso, Estudos prévios mostram que altos níveis séricos de CXCL8, IL-1 β e IL-6 são associados com pior prognóstico de performance cognitiva (SERRE-MIRANDA et al., 2020). TNF- α possui associação com sarcopenia e fragilidade associada com a idade (BIAN et al., 2017; MICHAUD et al., 2013).

Logo, nossos dados demonstraram que diversos desses marcadores séricos solúveis associadas com doenças ligadas ao envelhecimento estão de fato altas na velhice, mesmo em indivíduos saudáveis. Esse é um achado significativo que surge de estudos com indivíduos centenários, em que o aumento de mediadores inflamatórios (como por exemplo IL-6) são contrabalanceados por processos remodeladores anti-*inflammaging*. Toda via, *inflammaging* não é classificado nem como um processo benéfico nem deletério, uma vez que o envelhecimento saudável depende do componente genético e ambiental dos indivíduos, e também da capacidade de gerar processos de remodelamento (FULOP et al., 2021). Assim, para se indicar e diferenciar um acometimento relacionado a idade ou o envelhecimento saudável é necessário mais que um biomarcador isolado. Assim, uma análise integrativa da conectividade com outras moléculas, expresso em um modelo robusto, deve ser considerado. No presente estudo, a participação de mediadores solúveis na conectividade com a vizinhança, viabilizado pelo estudo das redes, mostrou que IL-1 β possui uma conectividade com outras moléculas durante toda a vida. Já TNF e IL-6 possuem conectividade com outras moléculas restrita a faixas etárias mais novas, enquanto CCL11 e CXCL8 demonstraram maior conectividade tanto nas primeiras faixas etárias quanto nas faixas de idade mais avançadas (<20^{Anos} e >51^{Anos}). Também é interessante ressaltar que nossos dados demonstraram que IL-4 e IL-10 também exibiram alta conectividade com outras moléculas durante toda a vida, sugerindo um importante papel no contrabalanceamento do fenômeno pro-inflamatório descrito no envelhecimento.

Um outro ponto relevante de se analisar no processo de imunossenescência é que ele não exprime um declínio contínuo em todo o sistema imune e suas funções, mas sim um processo que ocorre em ondas de mudanças durante certos períodos da vida (FARIA et al, 2008). Diante disso, nossos dados mostraram que, de maneira geral, as ondas de regulação positiva dos marcadores séricos solúveis são seguidas por mudanças na conectividade com a vizinhança que existe entre eles. Assim, nas faixas etárias que apresentam regulação positiva dos marcadores séricos solúveis (picos) possuem baixas conectividade com a vizinhança. Nesse caso, desponta um perfil particular nas mulheres em $>70^{\text{Anos}}$, quando o ritmo de regulação negativa dos marcadores séricos solúveis não é seguido por redução na conectividade com a vizinhança. Sendo perceptível que os rearranjos de reconstrução são mais frequentes e acontecem mais precoces nas mulheres ($11-20^{\text{Anos}}$, $51-60^{\text{Anos}}$ e $>70^{\text{Anos}}$) em relação aos homens ($21-30^{\text{Anos}}$ e $61-70^{\text{Anos}}$) (Figura 20). Corroborando com esses dados, Torres e colaboradores (2018) mais também demonstraram que o envelhecimento é acompanhado de redes com complexidade reduzida entre os marcadores séricos solúveis sendo observado menos conexões entre eles. E uma análise comparativa revelou que mulheres possuem mais conexões entre quimiocinas e citocinas, além do perfil de redes apresentar um encurtamento precoce das conexões. Ainda, em mulheres as conexões são refeitas em idades mais avançadas (TORRES et al., 2018).

Figura 20 – Visão dos Perfis dos Ritmos de Alterações e Conectividade dos Marcadores Séricos Solúveis Durante o Envelhecimento Saudável Perfis do ritmos de alterações e conectividade observado em 541 indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, subagrupados de acordo com o sexo (Homens = 230; Mulheres = 311), e categorizados em faixas etárias distintas. Os perfis foram desenhados como gráficos de linhas sobrepostas para melhor visualização das regulações positivas dos marcadores séricos solúveis em relação à conectividade para cada faixa etária.

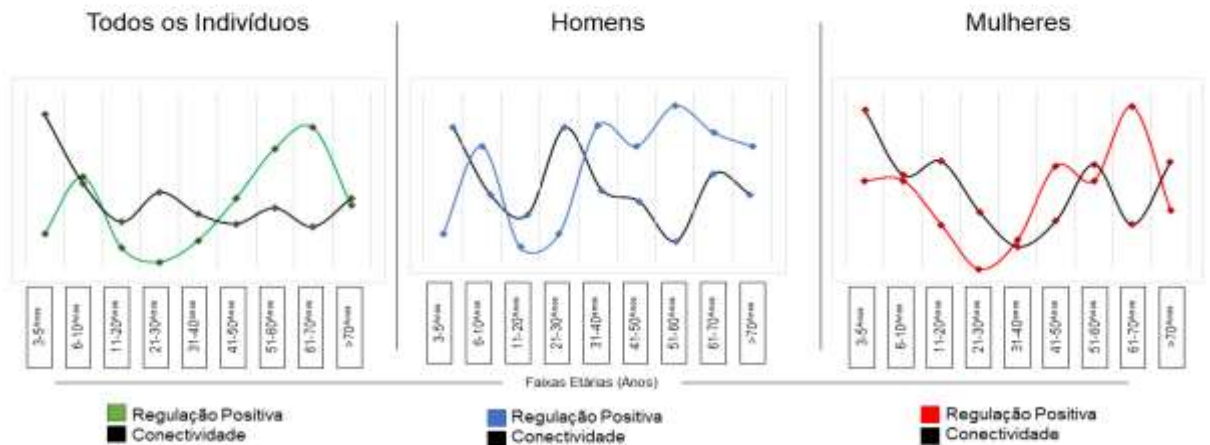


Figura 20

Fonte: Do autor

Outro ponto característico da imunossenescência que deve ser ressaltado é que o ritmo diferiu entre homens e mulheres, destacando a importância tanto de fatores genéticos como pós-genéticos, como os hormônios, no progresso das alterações imunológicas provocadas pelo envelhecimento. Uma demonstração disso pode ser notada nas diferenças na resposta imune contra infecções, como foi demonstrado recentemente por Takahashi et al, 2020 para a produção de citocinas e a imunidade celular contra SARS-CoV2. Nesse estudo é claramente mostrado que homens que produzem uma resposta mais inflamatória acompanhado de citotoxicidade celular menos robusta ao vírus possuem correlação com um acometimento maior da COVID-19 quando comparado com mulheres. Além disso, a resposta imune após infecções virais, como HIV, vírus da Hepatite B (HBV), assim como vacinas, contra vírus influenza, também difere entre os sexos. Em geral, homens tem maior carga viral contra HIV e HBV enquanto mulheres apresentam uma resposta imune mais robusta após vacina contra influenza (KLEIN E FLANAGAN, 2016). Outro fenômeno observado durante o envelhecimento é o declínio na produção de células T *naive* que acontece no timo, essa redução é mais precoce nos homens quando comparados as mulheres, além de ser acompanhada de uma imunossenescência acelerada ao avaliar-se alterações epigenéticas nas células imunes (MARQUEZ et al, 2020). Existem mecanismos que fornecem explicações concebíveis em respeito desse dimorfismo na resposta imune, como a existência de uma série de genes (como por exemplo Foxp3 e TLR7) que são codificados no cromossomo X (TAKAHASHI E IWASAKI, 2021), e ainda em

mulheres é observado uma maior expressão de fator regulador de interferon 5 (IRF5) o que explicaria uma resposta a infecções virais dependente de interferon mais elaborada. Outro componente relevante que ajuda a explicar o dimorfismo na resposta imune são os hormônios sexuais, que influenciam na atividade e proliferação de diversas células imunes (TAKAHASHI E IWASAKI, 2021). Esses impactos abrangem tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa, por exemplo, a testosterona regula positivamente a resposta Th1, aumenta a ativação de linfócitos TCD8⁺ e aumenta a produção de citocina reguladora IL-10, ao passo que regula negativamente a resposta das células natural killer (NK) e TNF. Já o estrogênio induz aumento da expressão de CCR5, e também estimula a resposta Th2 enquanto reduz a seleção negativa de células B auto reativas de alta afinidade (MARKLE E FISH, 2014; TANEJA, 2018). Sendo assim, nossos dados confirmam e também implementam informações a respeito da resposta imune distinta em diferentes faixas etárias durante o envelhecimento em homens e mulheres.

Por fim, nossos resultados sugerem que a eficiência do sistema imune para responder a mudanças durante o envelhecimento parece estar bem definido e pode alterar ao longo do tempo. Sugerem também que uma resposta imune efetiva durante a primeira e segunda infância caracterizada por uma forte conectividade com a vizinhança é de grande importância para manutenção da saúde durante a vida adulta. E com o avançar da idade, o sistema imune passa por um intenso ciclo de remodelação para alcançar um equilíbrio homeostático.

7. Observações Finais

O presente trabalho apresentou um perfil fenotípico cinético durante o envelhecimento saudável de acordo com o sexo, o qual enriquece a discussão sobre as mudanças na resposta imune que são dependentes do envelhecimento. Assim, em conjunto, nossos dados são úteis para profissionais da saúde e pesquisadores ao fornecer uma compreensão abrangente das mudanças dinâmicas complexas do sistema imune durante o envelhecimento saudável em ambos os sexos. Com isso os achados de nosso estudo podem subsidiar o estabelecimento de biomarcadores para monitoração do status de saúde durante o envelhecimento com uma interpretação integrativa das mudanças fisiológicas e/ou patológicas nos parâmetros imunológicos.

8. Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. São Paulo: Elsevier, 2015.

AKDIS M, BURGLER S, CRAMERI R, EIWEGGER T, FUJITA H, GOMEZ E, KLUNKER S, MEYER N, O'MAHONY L, PALOMARES O, RHYNER C, OUAKED N, SCHAFFARTZIK A, VAN DE VEEN W, ZELLER S, ZIMMERMANN M, AKDIS CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**. 2011 Mar;127(3):701-21.e1-70. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.050. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>

AKHA, SAA. Aging and the immune system: An overview. **J Immunol Methods**. 2018 Dec;463:21-26. doi: 10.1016/j.jim.2018.08.005. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.08.005>

ANTONELLI A, ROTONDI M, FALLAHI P, FERRARI SM, PAOLICCHI A, ROMAGNANI P, SERIO M, FERRANNINI E. Increase of CXC chemokine CXCL10 and CC chemokine CCL2 serum levels in normal ageing. **Cytokine**. 2006 Apr;34(1-2):32-8. doi: 10.1016/j.cyto.2006.03.012. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2006.03.012>

BALCH, W.E. et al. (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. **Science** 319, 916–919 <https://doi.org/10.1126/science.1141448>

BARTKE, A. (2008) Insulin and aging. **Cell Cycle** 7, 3338–3343 <https://doi.org/10.4161/cc.7.21.7012>

BASU S, DUNN A, WARD A. G-CSF: function and modes of action (Review). **Int J Mol Med**. 2002 Jul;10(1):3-10. <https://doi.org/10.3892/ijmm.10.1.3>

BECHER B, TUGUES S, GRETER M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. **Immunity**. 2016 Nov 15;45(5):963-973. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.026>

BERMAN H, HENRICK K, NAKAMURA H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. **Nat Struct Biol**. 2003 Dec;10(12):980. doi: 10.1038/nsb1203-980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>

BIAN AL, HU HY, RONG YD, WANG J, WANG JX, ZHOU XZ. A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- α . **Eur J Med Res**. 2017 Jul 12;22(1):25. doi: 10.1186/s40001-017-0266-9. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0266-9>

BILLIAU A, MATTHYS P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2009 Apr;20(2):97-113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.02.004>

BIRCH J, GIL J. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. **Genes Dev**. 2020 Dec 1;34(23-24):1565-1576. doi: 10.1101/gad.343129.120. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>

BONFANTE HL, ALMEIDA CS, ABRAMO C, GRUNEWALD STF, LEVY RA, TEIXEIRA HC. CCL2, CXCL8, CXCL9 and CXCL10 serum levels increase with age but are not altered by treatment with hydroxychloroquine in patients with osteoarthritis of the knees. **Int J Rheum Dis**. 2017 Dec;20(12):1958-1964. doi: 10.1111/1756-185X.12589. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12589>

BOTIGUÉ, L. R. et al. Ancient European dog genomes reveal continuity since the Early Neolithic. **Nature Communications**, v. 8, n. May, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms16082>

BRADLEY JR. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol.** 2008 Jan;214(2):149-60. doi: 10.1002/path.2287. <https://doi.org/10.1002/path.2287>

BURGLER S, OUAKED N, BASSIN C, BASINSKI TM, MANTEL PY, SIEGMUND K, MEYER N, AKDIS CA, SCHMIDT-WEBER CB. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. **J Allergy Clin Immunol.** 2009 Mar;123(3):588-95, 595.e1-7. doi: 10.1016/j.jaci.2008.12.017. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.017>

CARDOSO AL, FERNANDES A, AGUILAR-PIMENTEL JA, DE ANGELIS MH, GUEDES JR, BRITO MA, ORTOLANO S, PANI G, ATHANASOPOULOU S, GONOS ES, SCHOSSERER M, GRILLARI J, PETERSON P, TUNA BG, DOGAN S, MEYER A, VAN OS R, TRENDELENBURG AU. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. **Ageing Res Rev.** 2018 Nov;47:214-277. doi: 10.1016/j.arr.2018.07.004. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.07.004>

CASTRO, M. C., GURZENDA, S., TURRA, C. M., KIM, S., ANDRASFAJ, T., & GOLDMAN, N. (2021). Reduction in life expectancy in Brazil after COVID-19. **Nature Medicine**, 27(9), 1629–1635. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01437-z>

CHAN CW, CRAFTON E, FAN HN, FLOOK J, YOSHIMURA K, SKARICA M, BROCKSTEDT D, DUBENSKY TW, STINS MF, LANIER LL, PARDOLL DM, HOUSSEAU F. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. **Nat Med.** 2006 Feb;12(2):207-13. doi: 10.1038/nm1352. <https://doi.org/10.1038/nm1352>

CHARLTON RA, LAMAR M, ZHANG A, REN X, AJILORE O, PANDEY GN, KUMAR A. Associations between pro-inflammatory cytokines, learning, and memory in late-life depression and healthy aging. **Int J Geriatr Psychiatry.** 2018 Jan;33(1):104-112. doi: 10.1002/gps.4686. <https://doi.org/10.1002/gps.4686>

CIABATTINI A, NARDINI C, SANTORO F, GARAGNANI P, FRANCESCHI C, MEDAGLINI D. Vaccination in the elderly: The challenge of immune changes with aging. **Semin Immunol.** 2018 Dec;40:83-94. doi: 10.1016/j.smim.2018.10.010. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.010>

COPPÉ, J. P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>

DE ROSA L, DI STASI R, D'ANDREA LD. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. **Arch Biochem Biophys.** 2018 Dec 15;660:72-86. doi: 10.1016/j.abb.2018.10.010. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.10.010>

DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, SAWAYA BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res.** 2009 Jun;29(6):313-26. doi: 10.1089/jir.2008.0027. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

DVORAK HF, BROWN LF, DETMAR M, DVORAK AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol.** 1995 May;146(5):1029-39. PMID: 7538264

EYERICH S, EYERICH K, PENNINO D, CARBONE T, NASORRI F, PALLOTTA S, CIANFARANI F, ODORISIO T, TRIDL-HOFFMANN C, BEHRENDT H, DURHAM SR, SCHMIDT-WEBER CB, CAVANI A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset

involved in epidermal immunity and remodeling. **J Clin Invest.** 2009 Dec;119(12):3573-85. doi: 10.1172/JCI40202. <https://doi.org/10.1172/JCI40202>

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. doi: 10.1159/000156478. <https://doi.org/10.1159/000156478>

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 Jan;128(1):92-105. doi: 10.1016/j.mad.2006.11.016. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>

FRANCESCHI, C. et al. Inflammaging and ‘Garb-aging.’ **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 199–212, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.005>

FRANCESCHI, C. et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 908, p. 244–254, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>

FULOP T, LARBI A, PAWELEC G, KHALIL A, COHEN AA, HIROKAWA K, WITKOWSKI JM, FRANCESCHI C. Immunology of Aging: the Birth of Inflammaging. **Clin Rev Allergy Immunol.** 2021 Sep 18:1-14. doi: 10.1007/s12016-021-08899-6. <https://doi.org/10.1007/s12016-021-08899-6>

FULOP, T. et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>

FULOP, T. et al. On the immunological theory of aging. **Aging: Facts and Theories**, v. 39, p. 163–176, 2014. <https://doi.org/10.1159/000358904>

FÜLÖP, T.; LARBI, A.; WITKOWSKI, J. M. Human Inflammaging. **Gerontology**, v. 65, n. 5, p. 495–504, 2019. <https://doi.org/10.1159/000497375>

GADECKA, A.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A. Slowing down ageing: The role of nutrients and microbiota in modulation of the epigenome. **Nutrients**, v. 11, n. 6, 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11061251>

GORGOLIS V, ADAMS PD, ALIMONTI A, BENNETT DC, BISCHOF O, BISHOP C, CAMPISI J, COLLADO M, EVANGELOU K, FERBEYRE G, GIL J, HARA E, KRIZHANOVSKY V, JURK D, MAIER AB, NARITA M, NIEDERNHOFER L, PASSOS JF, ROBBINS PD, SCHMITT CA, SEDIVY J, VOUGAS K, VON ZGLINICKI T, ZHOU D, SERRANO M, DEMARIA M. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. **Cell.** 2019 Oct 31;179(4):813-827. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>

GORSKA-CIEBIADA M, SARYUSZ-WOLSKA M, BORKOWSKA A, CIEBIADA M, LOBA J. Adiponectin, leptin and IL-1 β in elderly diabetic patients with mild cognitive impairment. **Metab Brain Dis.** 2016 Apr;31(2):257-66. doi: 10.1007/s11011-015-9739-0. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9739-0>

GUEDJ, A. et al. Gut microbiota shape “inflamm-aging” cytokines and account for age-dependent decline in DNA damage repair. **Gut**, v. 69, n. 6, p. 1064–1075, 2020. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318491>

GUEX N, PEITSCH MC, SCHWEDE T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective. **Electrophoresis**. 2009 Jun;30 Suppl 1:S162-73. doi: 10.1002/elps.200900140. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>

HILL, S.; VAN REMMEN, H. Mitochondrial stress signaling in longevity: A new role for mitochondrial function in aging. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 936–944, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.07.005>

HOFFMAN, J. M. et al. The companion dog as a model for human aging and mortality. **Aging Cell**, v. 17, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1111/ace1.12737>

HSIEH CS, MACATONIA SE, TRIPP CS, WOLF SF, O'GARRA A, MURPHY KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**. 1993 Apr 23;260(5107):547-9. doi: 10.1126/science.8097338. <https://doi.org/10.1126/science.8097338>

HUANG J, KHADEMI M, FUGGER L, LINDHE Ö, NOVAKOVA L, AXELSSON M, MALMESTRÖM C, CONSTANTINESCU C, LYCKE J, PIEHL F, OLSSON T, KOCKUM I. Inflammation-related plasma and CSF biomarkers for multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2020 Jun 9;117(23):12952-12960. doi: 10.1073/pnas.1912839117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912839117>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação. 2021. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html?utm_source=portal&utm_medium=popclock&utm_campaign=novo_popclock. Acesso em: 09 ago. 2021

IVANOVSKA M, ABDI Z, MURDJEVA M, MACEDO D, MAES A, MAES M. CCL-11 or Eotaxin-1: An Immune Marker for Ageing and Accelerated Ageing in Neuro-Psychiatric Disorders. **Pharmaceuticals (Basel)**. 2020 Sep 2;13(9):230. doi: 10.3390/ph13090230. <https://doi.org/10.3390/ph13090230>

JIMENEZ, A. G. et al. Cellular metabolism and oxidative stress as a possible determinant for longevity in small breed and large breed dogs. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–20, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195832>

KARPUS WJ, KENNEDY KJ. MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. **J Leukoc Biol**. 1997 Nov;62(5):681-7. <https://doi.org/10.1002/jlb.62.5.681>

KENNEDY, B. K. et al. Geroscience: Linking aging to chronic disease. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 709–713, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>

KITAURA M, NAKAJIMA T, IMAI T, HARADA S, COMBADIÈRE C, TIFFANY HL, MURPHY PM, YOSHIE O. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. **J Biol Chem**. 1996 Mar 29;271(13):7725-30. doi: 10.1074/jbc.271.13.7725. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.13.7725>

KLEIN S.L. & FLANAGAN K.L. Sex differences in immune responses. **Nature Reviews Immunology**, 16: 626–638 (2016) <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol.** 2009;27:485-517. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>

LATORRE-PELLICER, A. et al. Mitochondrial and nuclear DNA matching shapes metabolism and healthy ageing. **Nature**, v. 535, n. 7613, p. 561–565, 2016. <https://doi.org/10.1038/nature18618>

LECHNER J, CHEN M, HOGG RE, TOTTH L, SILVESTRI G, CHAKRAVARTHY U, XU H. Peripheral blood mononuclear cells from neovascular age-related macular degeneration patients produce higher levels of chemokines CCL2 (MCP-1) and CXCL8 (IL-8). **J Neuroinflammation.** 2017 Feb 23;14(1):42. doi: 10.1186/s12974-017-0820-y. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0820-y>

LEOCÁDIO P, MENTA P, DIAS M, FRAGA J, GOULART A, SANTOS I, LOTUFO P, BENSENOR I, ALVAREZ-LEITE J. High Serum Netrin-1 and IL-1 β in Elderly Females with ACS: Worse Prognosis in 2-years Follow-up. **Arq Bras Cardiol.** 2020 May-Jun;114(3):507-514. English, Portuguese. doi: 10.36660/abc.20190035. <https://doi.org/10.36660/abc.20190035>

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: Structure and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 605–631, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>

LI, S. et al. Identification, replication and characterization of epigenetic remodelling in the aging genome: A cross population analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08346-7>

LIMA-COSTA MF, MELO MAMBRINI JV, LIMA TORRES KC, PEIXOTO SV, DE OLIVEIRA C, TARAZONA-SANTOS E, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA. Predictive value of multiple cytokines and chemokines for mortality in an admixed population: 15-year follow-up of the Bambui-Epigen (Brazil) cohort study of aging. **Exp Gerontol.** 2017 Nov;98:47-53. doi: 10.1016/j.exger.2017.08.002. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.002>

LOPEZ-OTIN, C. et al. (2013) The hallmarks of aging. **Cell** 153, 1194–1217 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

MARKLE JG, FISH EN. Sex matters in immunity. **Trends Immunol.** 2014 Mar;35(3):97-104. doi: 10.1016/j.it.2013.10.006. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.10.006>

MÁRQUEZ EJ, CHUNG CH, MARCHES R, ROSSI RJ, NEHAR-BELAID D, EROGLU A, MELLERT DJ, KUCHEL GA, BANCHEREAU J, UCAR D. Sexual-dimorphism in human immune system aging. **Nat Commun.** 2020 Feb 6;11(1):751. doi: 10.1038/s41467-020-14396-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14396-9>

MARTINS, R.; LITHGOW, G. J.; LINK, W. Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. **Aging Cell**, v. 15, n. 2, p. 196–207, 2016. <https://doi.org/10.1111/acel.12427>

MENTEN P, WUYTS A, VAN DAMME J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2002 Dec;13(6):455-81. doi: 10.1016/s1359-6101(02)00045-x. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00045-X)

MICHAUD M, BALARDY L, MOULIS G, GAUDIN C, PEYROT C, VELLAS B, CESARI M, NOURHASHEMI F. Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. **J Am Med Dir Assoc.** 2013 Dec;14(12):877-82. doi: 10.1016/j.jamda.2013.05.009. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>

MINCIULLO PL, CATALANO A, MANDRAFFINO G, CASCIARO M, CRUCITTI A, MALTESE G, MORABITO N, LASCO A, GANGEMI S, BASILE G. Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 2016 Apr;64(2):111-26. doi: 10.1007/s00005-015-0377-3. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0377-3>

MIYAMOTO K, ARAKI KY, NAKA K, ARAI F, TAKUBO K, YAMAZAKI S, MATSUOKA S, MIYAMOTO T, ITO K, OHMURA M, CHEN C, HOSOKAWA K, NAKAUCHI H, NAKAYAMA K, NAKAYAMA KI, HARADA M, MOTOYAMA N, SUDA T, HIRAO A (2007) Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. **Cell Stem Cell** 1, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.02.001>

MORGAN AR. et al. Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease plasma. **Alzheimers Dement.** 2019 Jun;15(6):776-787. doi: 10.1016/j.jalz.2019.03.007. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.03.007>

NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 2011. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>

NEVES CVB, MAMBRINI JVM, TORRES KCL, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, LIMA-COSTA MF, PEIXOTO SV. Association of metabolic syndrome with inflammatory markers in a sample of community-dwelling older adults. **Cad Saude Publica.** 2019 Mar 25;35(3):e00129918. English, Portuguese. doi: 10.1590/0102-311X00129918. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00129918>

NICHOLATOS, J. W. et al. Cellular energetics and mitochondrial uncoupling in canine aging. **GeroScience**, v. 41, n. 2, p. 229–242, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00062-6>

OUYANG L, ZHANG K, CHEN J, WANG J, HUANG H. Roles of platelet-derived growth factor in vascular calcification. **J Cell Physiol.** 2018 Apr;233(4):2804-2814. doi: 10.1002/jcp.25985. <https://doi.org/10.1002/jcp.25985>

PAIK, J.H. et al. (2009) FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. **Cell Stem Cell** 5, 540–553 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.013>

PANIZZUTTI B, GUBERT C, SCHUH AL, FERRARI P, BRISTOT G, FRIES GR, MASSUDA R, WALZ J, ROCHA NP, BERK M, TEIXEIRA AL, GAMA CS. Increased serum levels of eotaxin/CCL11 in late-stage patients with bipolar disorder: An accelerated aging biomarker? **J Affect Disord.** 2015 Aug 15;182:64-9. doi: 10.1016/j.jad.2014.12.010. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.12.010>

PANOWSKI, S.H. AND DILLIN, A. (2009) Signals of youth: endocrine regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. **Trends Endocrinol. Metab.** 20, 259–264 <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.03.006>

PAWELEC, G. Age and immunity: What is “immunosenescence”? **Experimental Gerontology**, v. 105, p. 4–9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.10.024>

POWERS, E.T. et al. (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annu. Rev. Biochem.** 78, 959–991 <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>

RAGHURAMAN G, HSIUNG J, ZUNIGA MC, BAUGHMAN BD, HITCHNER E, GUZMAN RJ, ZHOU W. Eotaxin Augments Calcification in Vascular Smooth Muscle Cells. **J Cell Biochem.** 2017 Mar;118(3):647-654. doi: 10.1002/jcb.25752. <https://doi.org/10.1002/jcb.25752>

RAOOF, M. et al. Mitochondrial peptides are potent immune activators that activate human neutrophils via FPR-1. **Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care**, v. 68, n. 6, p. 1328–1332, 2010. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181dcd28d>

RAPHAEL I, NALAWADE S, EAGAR TN, FORSTHUBER TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**. 2015 Jul;74(1):5-17. doi: 10.1016/j.cyto.2014.09.011. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>

SERRE-MIRANDA C, ROQUE S, SANTOS NC, COSTA P, SOUSA N, PALHA JA, CORREIA-NEVES M. Cognition Is Associated With Peripheral Immune Molecules in Healthy Older Adults: A Cross-Sectional Study. **Front Immunol.** 2020 Sep 2;11:2045. doi: 10.3389/fimmu.2020.02045. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02045>

SIGNER, R.A. AND MORRISON, S.J. (2013) Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. **Cell Stem. Cell** 12, 152–165 <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.001>

SIMON AK, HOLLANDER GA, MCMICHAEL A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. **Proc Biol Sci.** 2015 Dec 22;282(1821):20143085. doi: 10.1098/rspb.2014.3085. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.3085>

SINGH, T.; NEWMAN, A. B. Inflammatory markers in population studies of aging. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 3, p. 319–329, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.11.002>

TAKAHASHI T, ELLINGSON MK, WONG P, ISRAELOW B, LUCAS C, KLEIN J, SILVA J, MAO T, OH JE, TOKUYAMA M, LU P, VENKATARAMAN A, PARK A, LIU F, MEIR A, SUN J, WANG EY, CASANOVAS-MASSANA A, WYLLIE AL, VOGELS CBF, EARNEST R, LAPIDUS S, OTT IM, MOORE AJ; YALE IMPACT RESEARCH TEAM, SHAW A, FOURNIER JB, ODIO CD, FARHADIAN S, DELA CRUZ C, GRUBAUGH ND, SCHULZ WL, RING AM, KO AI, OMER SB, IWASAKI A. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. **Nature**. 2020 Dec;588(7837):315-320. doi: 10.1038/s41586-020-2700-3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2700-3>

TAKAHASHI T, IWASAKI A. Sex differences in immune responses. **Science**. 2021 Jan 22;371(6527):347-348. doi: 10.1126/science.abe7199. <https://doi.org/10.1126/science.abe7199>

TANEJA V. Sex Hormones Determine Immune Response. **Front Immunol.** 2018 Aug 27;9:1931. doi: 10.3389/fimmu.2018.01931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01931>

TARGOWSKI T, JAHNZ-RÓZYK K, PLUSA T, GLODZINSKA-WYSZOGRODZKA E. Influence of age and gender on serum eotaxin concentration in healthy and allergic people. **J Investig Allergol Clin Immunol**. 2005;15(4):277-82. PMID: 16433209.

TAYLOR, R.C. AND DILLIN, A. (2011) Aging as an event of proteostasis collapse. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 3, a004440 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004440>

TORRES KCL, REZENDE VB, LIMA-SILVA ML, SANTOS LJS, COSTA CG, MAMBRINI JVM, PEIXOTO SV, TARAZONA-SANTOS E, MARTINS FILHO OA, LIMA-COSTA MF, TEIXEIRA-CARVALHO A. Immune senescence and biomarkers profile of Bambuí aged population-based cohort. **Exp Gerontol**. 2018 Mar;103:47-56. doi: 10.1016/j.exger.2017.12.006. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.006>

TOTHOVA, Z. et al. (2007) FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. **Cell** 128, 325–339 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.003>

VALIATHAN R, ASHMAN M, ASTHANA D. Effects of Ageing on the Immune System: Infants to Elderly. **Scand J Immunol**. 2016 Apr;83(4):255-66. doi: 10.1111/sji.12413. <https://doi.org/10.1111/sji.12413>

VILCHEZ, D.; SIMIC, M. S.; DILLIN, A. Proteostasis and aging of stem cells. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 3, p. 161–170, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.09.002>

WATERHOUSE A, BERTONI M, BIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER FT, DE BEER TAP, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Res**. 2018 Jul 2;46(W1):W296-W303. doi: 10.1093/nar/gky427. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ageing and health. **Fact sheet**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> (February), 2018.

ZLOTNIK A, YOSHIE O. The chemokine superfamily revisited. **Immunity**. 2012 May 25;36(5):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.008. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>

Anexo 1:

INSTITUTO RENÉ RACHOU
FIOCRUZ- MINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Imunidade Humoral e Celular em Crianças e Adultos submetidos à Primovacinação Antiamarílica 17DD com Dose Fracionada

Pesquisador: MartinsFilho OA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 82357718.5.0000.5091

Instituição Proponente: Instituição Instituto René Rachou/FIOCRUZ Minas

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Parcial

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 15/04/2020

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.030.110

Apresentação da Notificação:

Trata-se de notificação no âmbito do projeto de pesquisa "Imunidade Humoral e Celular em Crianças e Adultos submetidos à Primovacinação Antiamarílica 17DD com Dose Fracionada", aprovado por este Comitê em 29/01/18 por meio do Parecer 2.476.277. Foram aprovadas também duas emendas: Emenda 1 em 26/03/19 (Parecer 3.222.011) e Emenda 2 em 05/12/19 (Parecer 3.746.728).

Resumo: em 2009, foi realizado um estudo clínico de dose resposta da vacina 17DD de febre amarela 17DD (VFA-17DD) produzida por BioManguinhos/FIOCRUZ, cujos resultados foram publicados em 2013. Foi um estudo randomizado, duplo cego, com 900 adultos, do sexo masculino, jovens e saudáveis, de Unidades Militares do Estado do Rio de Janeiro, uma área não endêmica. Os participantes foram distribuídos em 6 grupos, cada braço com 150 participantes. Os

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715
Bairro: Barro Preto **CEP:** 30.190-002
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqr@cpqr.fiocruz.br