

Iara Grigoletto Fernandes

***Inflammaging*: investigação sobre envelhecimento cutâneo,
imunossenescência e SARS-CoV-2**

São Paulo

2023

Iara Grigoletto Fernandes

***Inflammaging*: investigação sobre envelhecimento cutâneo,
imunossenescência e SARS-CoV-2**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria
Notomi Sato

(Versão Corrigida Conforme Resolução CoPGr6018/11)

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Iara Grigoletto
Inflammaging: investigação sobre envelhecimento cutâneo, imunossenescência e
SARS-CoV-2 / Iara Grigoletto Fernandes. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de
Dermatologia.
Orientadora: Maria Notomi Sato

Descritores: 1.Estresse oxidativo 2.Envelhecimento cutâneo 3.Resveratrol
4.Antioxidantes 5.*Inflammaging* 6.COVID -19

USP/FM/DBD-447/23

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus, a todos os eventos do Universo e à força que me conduziu até aqui**. Apesar de cientista, tenho certeza que, acima de tudo, existe algo muito maior e divino que nos ilumina e nos conduz para a evolução em todos os sentidos, se assim permitirmos.

Agradeço à **Profa. Dra. Maria Notomi Sato**, orientadora desse e de tantos outros trabalhos brilhantes, que, desde o momento em que pisei no LIM-56, já se mostrou uma pessoa extremamente receptiva, acolhedora e uma excelente pesquisadora. Minha admiração foi imediata e só cresceu ao longo desses anos de orientação e parceria. Obrigada por sempre estar presente em todas as etapas da nossa formação enquanto alunos de pós-graduação e seres humanos, pelas colocações, correções de manuscritos (não foram poucas!) e compreensão.

Agradeço aos colaboradores **Dr. Amadeu Queiróz, Dr. Frederico Moraes Ferreira, Dra. Fernanda Guedes, Dr. Amaro Nunes Duarte Neto, Dra. Mirian Nacagami Sotto, Dra. Tatiana Mina Yendo e Dra. Marcelle Nogueira** pelo profissionalismo, empenho e extrema qualidade que a participação de vocês agregou neste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos do grupo de pesquisa, que também foram colaboradores importantíssimos (em ordem alfabética, para não dar briga): **Dra. Anna Cláudia, Dra. Anna Júlia, MSc Danielle, MSc Emanuelle, MSc Emilly, Dra. Franciane, Dr. Fábio Seiti, Dr. Gabriel, Gabriela, Dr. Josenilson, Julia Cataldo, Julia Galano, Dra. Kelly, Dra. Luana, Letícia, Dra. Marina, MSc Milena, Dra. Nátalli, Dr. Ricardo, MSc Sarah, MSc Tayna e Dra. Yasmim**. Vocês foram essenciais para todo o meu aprendizado seja para técnicas laboratoriais, análise de dados, escrita e para a prática científica como um todo. Vocês mereciam uma página inteira de agradecimentos só para vocês! Além de colegas de trabalho, muitos hoje levo como amigos do coração. Sem vocês, esse trabalho não seria concretizado e minha formação não seria tão rica.

Agradeço aos meus pais **Carlos Fernandes e Nanci Grigoletto**, que, antes de mais nada, me deram o maior presente possível: a vida. Desde a infância acreditaram em mim e na minha educação. Foi a força e apoio de vocês que tornou possível hoje a minha formação como Doutora em Ciências pela Universidade de São Paulo. Mãe, você merece destaque aqui. Afinal, além de todo apoio, também me ajudou na

logística de recrutar voluntárias para o estudo e foi também uma voluntária! Obrigada por ser esse anjo fantasiado de mãe.

Agradeço ao meu companheiro **Wagner Albuquerque**, também cientista e professor, que acima de “namorado”, foi meu melhor amigo em boa parte da realização deste trabalho, me dando todo tipo de apoio, escutando meus choros, angústias e estresses, mas também brindando comigo cada pequena vitória. Seu amor me cura todos os dias e me eleva para o meu melhor como pessoa.

Agradeço à toda a minha família, em especial meu irmão **Guilherme Grigoletto Fernandes**, um vegetariano amante do resveratrol, pelo apoio, amizade, momentos felizes de joguinhos de tabuleiro e por sempre acreditar em mim, e, fazer questão de sempre me lembrar que terei a responsabilidade e honra de ser a primeira doutora da família.

Agradeço a **todos os funcionários e colaboradores do LIM-56** por toda parceria, profissionalismo e por tudo que aprendi com vocês desde a minha época de aprimoranda recém-chegada ao laboratório.

Agradeço à **Ruth e ao Marcelo**, funcionários da secretária do Departamento de Dermatologia da FMUSP, por toda orientação burocrática e auxílio durante todo o doutorado.

Agradeço aos integrantes da banca de qualificação, **Profa. Dra. Valéria Aoki, Dr. Cyro Brito e Dra. Juliana Ruiz**. As colocações de vocês foram essenciais para subtrair o melhor do presente trabalho.

Agradeço às agências de fomento **CAPES, FAPESP e CNPq** pelo apoio financeiro.

Respeitosamente, agradeço à todas as **minhas voluntárias e aos familiares de vítimas da assombrosa COVID-19** pela confiança depositada em mim, nos colaboradores do trabalho e na ciência, ao colaborarem com a doação de amostras biológicas para o nosso estudo. Minha maior forma de agradecer é divulgar com o máximo de qualidade dados que possam contribuir para respostas, ou pelo menos, parte de respostas de perguntas ainda não respondidas!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse estudo: **MUITO OBRIGADA!**

“Para ser grande, sê inteiro:
nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago
a lua toda brilha
porque alta vive.”

Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 O envelhecimento cutâneo	19
1.2 Envelhecimento cutâneo extrínseco	21
1.3 Envelhecimento cutâneo cronológico	22
1.4 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio	23
1.5 <i>Inflammaging</i>	26
1.5.1 <i>Inflammaging</i> sistêmico e COVID-19 na pele	27
1.6 Imunossenescência e imunidade inata	28
1.7 Resveratrol	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivos específicos	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Casuística.....	33
3.1.1 Estudo do envelhecimento cutâneo e celular	33
3.1.2 Casuística – estudo da pele na infecção por COVID-19	33
3.2 Coleta das amostras	34
3.2.1 Biopsias de pele para estudo de envelhecimento cronológico.....	34
3.2.2 Biopsias de pele para estudo do fotoenvelhecimento	34
3.2.3 Amostra sanguínea	34
3.3 PCR em tempo real (qPCR).....	34
3.4 Imunohistoquímica e análise das lâminas	36
3.5 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e estímulo com agonistas de TLRs	37
3.6 Viabilidade celular em PBMCs.....	38
3.7 Quantificação de citocinas	38
3.8 Extração de RNA, sequenciamento e análises transcriptômica em amostras cutâneas COVID-19	39
3.9 Análise estatística	40

4 RESULTADOS.....	41
4.1 Características das voluntárias envolvidas no estudo do envelhecimento cutâneo cronológico	41
4.2 Avaliação dos dados transcricionais na pele cronologicamente envelhecida	42
4.2.1 Avaliação proteica de alvos diferencialmente expressos em pele envelhecida cronologicamente	43
4.3 Comparação entre dados transcricionais na pele no envelhecimento cutâneo: intrínseco e fotoenvelhecimento	45
4.4 Características dos pacientes e dos voluntários envolvidos no estudo do transcriptoma COVID-19	47
4.5 Análise transcriptômica de COVID-19 cutâneo	48
4.6 Efeito do resv na produção de citocinas de células mononucleares de idosas ...	54
4.6.1 Efeito do resv na resposta transcricional de pbmcs em estímulos com agonistas de TLRs	55
4.6.2 Efeito do resv na produção de citocinas e quimiocinas de pbmcs a estímulos com agonistas de TLRs.....	63
5. DISCUSSÃO	66
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
7. REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 – Proteína ativadora 1

APOE - Apolipoproteína E

ARE - Elementos de resposta antioxidante

BCL2 - Regulador de apoptose BCL2

CCL - Quimiocina da família CC

CCN3 - Fator 3 da rede de comunicação celular

cDNA - DNA complementar

CEBPD - Proteína Delta de Ligação ao Intensificador CCAAT

CMN - Célula mononucleares

COL1A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo I

COL3A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo III

COL5A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo V

COL9A2 - Cadeia Alfa 2 de Colágeno Tipo IX

COL14A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo XIV

COL23A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo XXIII

COL24A1 - Cadeia Alfa 1 de Colágeno Tipo XXIV

COVID-19 - Doença do Coronavírus

CXCL - Ligante de quimiocina com motivo CXC

DC - Célula dendrítica

DM – Diabetes mellitus

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsDNA - DNA dupla fita

dsRNA - RNA dupla fita

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

DUSP1 - Fosfatase 1 de dupla especificidade

ELANE - Elastase, Neutrófilos Expressos

ESF – Fator epidérmico solúvel

ERK - Quinase regulada por sinal extracelular

FGF2 - Fator de crescimento fibroblástico básico tipo 2

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPC1 - Glypicano 1

GPX1 – Glutathione peroxidase

HDAC4 - Histona Desacetilase 4

HO-1 - Heme oxigenase-1

HSV - Vírus herpes simples

IFN - Interferon

IL - Interleucina

IRF - Fator regulador de interferon

JNK - c-Jun quinase N-terminal

Keap1 - Proteína 1 associada a ECH

LBP - Proteína de ligação a lipopolissacarídeos

LC – Célula de Langerhans

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Proteína ativada por mitógeno quinase

MEC – Matriz extracelular

MMP – Metaloproteinase de matriz

MxA - Proteína de resistência ao mixovírus A

MyD88 - Fator 88 de diferenciação mielóide

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NOTCH2 - Receptor do tipo Notch 2

NR4A1 - Subfamília de Receptores Nucleares 4 Grupo A Membro 1

Nrf2 - Fator nuclear derivado de eritróide 2

p38 – Proteína 38

PAMP - Padrão molecular associado a patógenos

PBMC - Célula mononuclear de sangue periférico

PCR - Reação em cadeia da polymerase

PLA2G2A - Fosfolipase A2 Grupo IIA

PLSCR1 - Scramblase Fosfolipídico 1

PRR - Receptores de reconhecimento de padrão

PTPN3 - Proteína Tirosina Fosfatase Não Receptor Tipo 3

qPCR - PCR em tempo real

RL – Radicais livres

RNA - Ácido ribonucleico

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SAA1 - Soro Amiloide A1

SIRT1 – Sirtuína 1

SOCS3 - Supressor de sinalização de citocinas 3

SOD2 – Superóxido dismutase 2

ssDNA - DNA simples fita

ssRNA - RNA simples fita

STING - Estimulador de genes de interferon

TIMP1 - Inibidor tecidual de metaloproteinase do tipo 1

TIMP2 - Inibidor tecidual de metaloproteinase do tipo 2

TLR - Receptor do tipo *Toll*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TPPP - Proteína Promotora de Polimerização de Tubulina

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunidade inata na pele.....	20
Figura 2. Via de ativação de Nrf2.....	24
Figura 3. As vias de ação do resveratrol.....	30
Figura 4. Perfil transcricional de envelhecimento cutâneo cronológico.....	43
Figura 5. Expressão de Nrf2 em pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas.....	44
Figura 6. Expressão de IRF3 em pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas.....	45
Figura 7. Perfil transcricional de envelhecimento cronológico em comparação ao fotoenvelhecimento cutâneo.....	46
Figura 8. Análises transcriptômicas cutâneas de pacientes falecidos por COVID-19.....	49
Figura 9. Rede gênica da via da resposta inflamatória aguda.....	51
Figura 10. Rede gênica da via de desmontagem da matriz extracelular.....	52
Figura 11. Rede gênica da via de resposta celular às espécies reativas de oxigênio.....	53
Figura 12. Rede gênica da atividade de MAPK.....	54
Figura 13. Viabilidade celular em PBMCs.....	55
Figura 14. Cinética tempo de cultura para avaliação de transcritos.....	56
Figura 15. <i>Heatmap</i> de alvos destaques da expressão de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR3 (POLY I:C) e adição de Resv (n=20).....	57
Figura 16. <i>Heatmap</i> da expressão e destaques de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR 4 (LPS) e adição de Resv (n=20).....	58
Figura 17. <i>Heatmap</i> da expressão de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR 7/8 (CL097) e adição de Resv (n=20).....	59
Figura 18. Efeito do Resv na expressão transcricional de fatores antioxidantes em PBMCs.....	60

Figura 19. Efeito do Resv na expressão transcricional de fatores antivirais em PBMCs.....62

Figura 20. Produção de citocinas por PBMCs de voluntárias jovens e idosas após o estímulo com agonistas de TLR e tratamento com Resv.....64

Figura 21. Produção de quimiocinas por PBMCs de voluntárias jovens saudáveis e voluntárias idosas saudáveis após o estímulo com agonistas de TLR e tratamento com Resv.....65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para qPCR de amostras de pele e de PBMCs.....	35
Tabela 2 – Anticorpos utilizados para marcação em imunohistoquímica na pele.....	37
Tabela 3 – Painel com limite mínimo de detecção de citocinas.....	38
Tabela 4 – Características do grupo amostral jovem.....	41
Tabela 5 – Características do grupo amostral idoso.....	41
Tabela 6 – Características do grupo amostral de controles saudáveis (CT).....	47
Tabela 7 – Características do grupo amostral de pacientes COVID-19 (CV).....	47

RESUMO

Fernandes IG. *Inflammaging*: investigação sobre envelhecimento cutâneo, imunossenescência e SARS-CoV-2 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A imunossenescência pode favorecer infecções seja por vírus, bactérias ou fungos, e, pode estar associada a um aumento de respostas inflamatórias mediadas por citocinas pró-inflamatórias, característica do processo denominado *inflammaging*. O impacto na pele é, nesse sentido, relevante, considerando a exposição aos raios ultravioleta, aos patógenos do ambiente externo e a alteração da microbiota. A busca por compostos naturais com potencial anti-inflamatório e antioxidante tem sido de interesse. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é avaliar o envelhecimento cutâneo cronológico pela expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, respostas inflamatórias e antivirais em biopsias de pele (não fotoexposta e fotoexposta) de indivíduos jovens e idosos saudáveis, bem como investigar a inflamação e estresse oxidativo na pele de indivíduos com COVID-19, na forma grave da doença. O efeito do polifenol resveratrol (Resv) foi avaliado em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos mesmos grupos amostrais supracitados, na resposta a estímulos inatos, como agonistas de receptor *Toll like 3* (POLY I:C), *Toll like 4* (LPS) e *Toll like 7/8* (CL097), quanto à expressão de transcritos e produção de citocinas. Nossos dados mostram que, no envelhecimento cutâneo cronológico (pele não fotoexposta de idosas), há alteração da expressão transcricional do inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP1) e do fator de crescimento de fibroblastos (FGF2). A expressão proteica do fator antiviral IRF3 mostrou maior expressão epidérmica em idosas. Em contraste, a pele fotoexposta de idosas, mostrou, molecularmente, aumento de alvos antioxidantes (catalase e GPX1), bem como de TIMP1 e FGF2. Além disso, os resultados obtidos *in vitro* com PBMCs mostram que o Resv regula positivamente a expressão de fatores antioxidantes, como catalase (CAT) e Sirtuína 1 (SIRT1) e negativamente os genes antivirais como proteína A de resistência ao mixovírus (MxA), estimulador da resposta do interferon (STING) e fator 7 regulatório do interferon (IRF7), possivelmente por reduzir os efeitos inflamatórios dos genes induzidos pela via do interferon (IFN). Não obstante, o efeito anti-inflamatório deste composto foi detectado pela inibição dos níveis de secreção das interleucinas IL-1 β , TNF- α e IL-10, bem como pelas quimiocinas CCL2 e CCL5, induzidas pela estimulação de TLR4 e TLR7/8. A análise do transcriptoma de amostras de pacientes com a forma grave de COVID-19 identificou genes com regulação alterada em relação a indivíduos saudáveis. Os resultados das análises mostraram um aumento da expressão de genes inflamatórios e genes relacionados à resposta oxidativa, levando à ativação de vias relacionadas à degradação da matriz extracelular (MEC) e ao aumento de expressão das MAPKs. Em conjunto, tais achados mostram possíveis indicadores atuantes no envelhecimento intrínseco, como o TIMP1 e FGF2, e evidenciam o potencial modulador *in vitro* do resveratrol, quanto a capacidade de estimular os

fatores antioxidantes e de reduzir a resposta inflamatória induzidas em células mononucleares, mesmo em indivíduos idosos. As análises de redes gênicas obtidas a partir de vias relacionadas à infecção por COVID-19, mostraram um aumento de genes de inflamação aguda, estresse oxidativo, desmontagem da MEC e atividade de MAPKs, com destaque para aumento de genes como IL-6, TL4, CEBPD, CXCL8, JUN/JUNB, MAPK7 e genes da família das metaloproteinases (MMPs), sugerindo a inflamação sistêmica do vírus SARS-CoV-2 também em um contexto cutâneo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Envelhecimento cutâneo. Resveratrol. Antioxidantes. *Inflammaging*. COVID-19.

ABSTRACT

Fernandes IG. *Inflammaging*: investigation on skin aging, immunosenescence and SARS-CoV-2 [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Immunosenescence may favor infections whether caused by viruses, bacteria or fungi. It may be associated with an increased inflammatory response mediated by pro-inflammatory cytokines, characteristic of the process called inflammaging. In this context, the impact on the skin is relevant, considering exposure to ultraviolet rays, pathogens from the external environment and microbiota alterations. The search for natural compounds with anti-inflammatory and antioxidant potential has been of interest. Therefore, the objective of the study is to evaluate chronological skin aging through the expression of genes related to oxidative stress, inflammatory and antiviral responses in skin biopsies (non-photoexposed and photoexposed) from healthy young and elderly individuals, as well as investigating inflammation and oxidative stress in the skin of individuals with COVID-19, in the severe form of the disease. The effect of the polyphenol resveratrol (Resv) was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the same sample groups mentioned above, in response to innate stimuli, such as Toll like 3 receptor agonists (POLY I:C), Toll like 4 (LPS) and Toll like 7/8 (CL097), regarding the expression of transcripts and production of cytokines. Our data show that in chronological skin aging (non-photoexposed skin of elderly women) expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) and fibroblast growth factor (FGF2) was upregulated. The protein expression of the antiviral factor IRF3 showed increased expression in the epidermis of elderly women. In contrast, photoexposed skin of elderly women showed, molecularly, an increase in antioxidant targets (catalase and GPX1), as well as TIMP1 and FGF2. Furthermore, the results obtained *in vitro* with PBMCs show that Resv positively regulates the expression of antioxidant factors, such as catalase (CAT) and Sirtuin 1 (SIRT1) and negatively regulates antiviral genes such as myxovirus resistance protein A (MxA), a stimulator of interferon response (STING) and interferon regulatory factor 7 (IRF7), possibly by reducing the inflammatory effects of genes induced by the interferon (IFN) pathway. Nevertheless, the anti-inflammatory effect of this compound was detected by the inhibition of the secretion levels of the interleukins IL-1 β , TNF- α and IL-10, as well as the chemokines CCL2 and CCL5, induced by the stimulation of TLR4 and TLR7/8. Transcriptome analysis of samples from patients with severe COVID-19 identified genes with altered regulation compared to healthy individuals. Results showed an upregulation of inflammatory genes and genes related to the oxidative response, leading to the activation of pathways related to the degradation of the extracellular matrix (ECM) and an increase in the expression of MAPKs. Taken together, these findings show possible indicators acting on intrinsic aging, such as TIMP1 and FGF2, and highlight the *in vitro* modulating potential of resveratrol, regarding the ability to stimulate

antioxidant factors and reduce the inflammatory response induced in PBMCs, even in elderly individuals. Gene network analyzes obtained from pathways related to COVID-19 infection showed an increase in genes for acute inflammation, oxidative stress, ECM disassembly and MAPK activity, with emphasis on an increase in genes such as IL-6, TL4, CEBPD, CXCL8, JUN/JUNB, MAPK7 and genes from the metalloproteinase family (MMPs), suggesting systemic inflammation of the SARS-CoV-2 virus also in a cutaneous context.

Keywords: Oxidative stress. Skin aging. Resveratrol. Antioxidants. Inflammaging. COVID-19.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O envelhecimento cutâneo

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa uma importante barreira física, que separa o organismo do ambiente externo, assumindo ação protetora contra todas as possíveis influências ambientais (Ichihashi, Ueda et al. 2003). Esta é composta por três principais camadas: a epiderme externa com multicamadas, a derme e a hipoderme. A epiderme é formada, em sua maioria (90%), por queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans (LC). Sendo estas últimas um tipo de célula dendrítica (DC) especializada em capturar antígenos presentes na camada mais superficial, e, portanto, mais exposta da pele (Kubo, Nagao et al. 2009). A derme, por outro lado, é uma camada derivada do mesoderma. Nela está presente a matriz extracelular (MEC) densa, com fibroblastos disseminados, onde, além de comporem boa parte da derme, são os responsáveis pela produção de fibras de colágeno e elastina. É também nessa camada cutânea que se encontram inclusos anexos como os folículos capilares, glândulas sebáceas, terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, além da relevante presença de células do sistema imune, como macrófagos, DCs, células natural killer (NK), linfócitos e mastócitos (Weihermann, Lorencini et al. 2017). A camada mais profunda da pele é a hipoderme, composta por tecido conjuntivo e adiposo, com alta taxa de vascularização (Guerrero-Juarez and Plikus 2018).

Elementos cutâneos estão constantemente expostos a uma ampla gama de estressores externos: contato com patógenos microbianos, ação de raios UV, calor, frio e poluição atmosférica (Puizina-Ivic 2008). Os peptídeos antimicrobianos são derivados de queratinócitos durante o processo de diferenciação para combater os agentes patogênicos na superfície da pele e são essenciais na defesa inata (Coates, Blanchard et al. 2018). A microbiota exerce influência sob as células T da pele, preparando-as para responder aos agentes patogênicos, além de contribuir nas funções desempenhadas pelos queratinócitos, LCs, células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos e fibroblastos, que expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e detectam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que, por sua vez, ativam a resposta imune inata (figura 1)

(Kawamura, Ogawa et al. 2014). No entanto, idosos apresentam diferenças no microambiente da pele e, portanto, na microbiota colonizadora, o que pode influenciar na eficiência da resposta imune nesses indivíduos (Somerville 1969, Rafat, Hashemi et al. 2017).

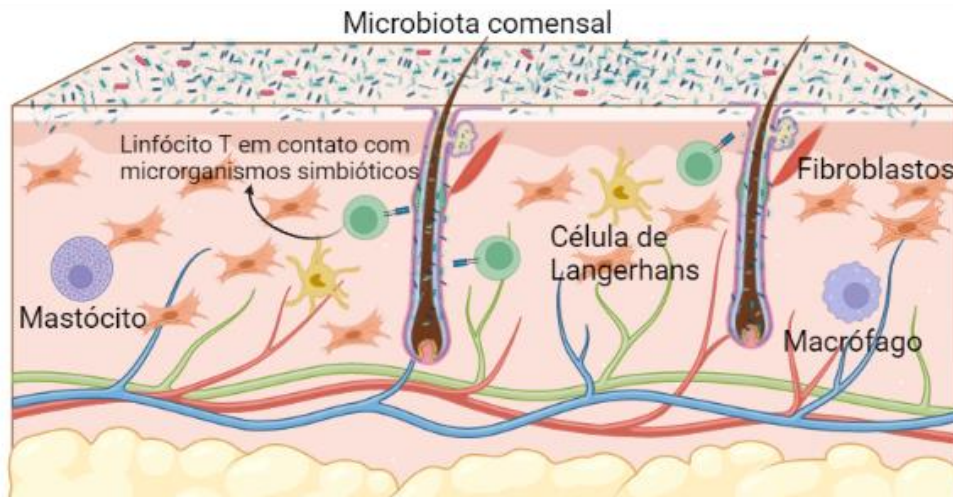


Figura 1. Imunidade inata na pele. Representação da pele e sua microbiota comensal. Células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos, fibroblastos na derme e a microbiota comensal na parte externa da epiderme, evidenciando a importância via reconhecimento destes microrganismos por linfócitos T, gerando tolerância e ativação de respostas inatas. Criado com: BioRender.

O processo de envelhecimento cutâneo pode ser caracterizado principalmente pela ruptura da matriz dérmica celular, a perda de resistência ao contato mecânico externo e da elasticidade, cicatrização de feridas prejudicada, aparecimento de rugas e manchas, e, perda do tom natural da pele (Lephart 2016). Mesmo não sendo considerado uma patologia, o envelhecimento da pele pode ser considerado um reflexo de condições de saúde física, psicológica e hábitos de vida como um todo, além de estar associado a aspectos relacionados à diferenças étnicas e culturais.

Em circunstância onde há perturbação da barreira cutânea por microrganismos patogênicos, a microbiota comensal residente e o tecido sofrem constantemente alterações, o que pode causar infecção e, em um primeiro momento, ativação da imunidade inata na pele devido a tal dano. Indivíduos idosos são mais frequentemente afetados por diversas afecções dermatológicas do que populações mais jovens e de meia-idade, incluindo nestas o aumento de dermatite,

eczema, dermatoses pruriginosas, distúrbios autoimunes e infecções por Herpes Zóster, o que provavelmente está relacionado à imunossenescência (Farage, Miller et al. 2009, Kim, Park et al. 2015, Kinn, Holdren et al. 2015, Handfield, Kwock et al. 2018).

Nesse contexto, aspectos relacionados ao estresse oxidativo são relevantes, como a disfunção mitocondrial, comunicação intracelular alterada, instabilidade genômica, senescência celular e quebra da matriz extracelular (MEC). Ainda, enzimas esteroidais, receptores enzimáticos e hormônios também são fatores que, em conjunto com a influência de fatores genéticos, favorecem e aceleram o processo de envelhecimento (Kammeyer and Luiten 2015, Lephart 2016).

1.2 Envelhecimento cutâneo extrínseco

Existem dois grandes fatores estudados que estão relacionados ao envelhecimento da pele: o envelhecimento extrínseco e o envelhecimento cronológico. O fator extrínseco de maior relevância dermatológica é a exposição excessiva a raios ultravioleta (UV). Dentre outros fatores relevantes, porém, de menor impacto, são citados a poluição atmosférica, o tabagismo e o alcoolismo (Jenkins 2002, Puizina-Ivic 2008, Jung, Kwon et al. 2022).

Considerando a radiação UV, tanto a radiação UVA (com comprimento de onda 320 a 400 nm), quanto a radiação UVB (290 a 320 nm) causam danos importantes à pele. Enquanto que a intensa exposição à radiação UVA gera danos tanto na epiderme, quanto na derme e induz o envelhecimento em larga escala, a radiação UVB afeta especialmente a epiderme, uma vez que é o local onde é melhor absorvida. Por mecanismos diretos e indiretos, a radiação UVB danifica e gera mutações no material genético de queratinócitos e melanócitos, levando à produção do fator epidérmico solúvel (ESF) e enzimas proteolíticas, que podem ser encontradas na derme após a exposição aos raios UV (Scharffetter–Kochanek, Brenneisen et al. 2000).

Quando se leva em consideração a exposição solar de forma crônica, a radiação UVB mostra consequências importantes, como a diminuição da biossíntese do procolágeno e o estímulo à degradação do colágeno, especialmente devido à ação da metaloproteinase do tipo 1 (MMP-1). A MMP-1 é capaz de realizar a clivagem de colágeno tipo I, II e III, especificamente, no domínio helicoidal (Dong,

Damaghi et al. 2008, Jung, Kwon et al. 2022). As MMPs formam um grupo de endopeptidases dependentes de zinco com mais de 20 membros diferentes e representam enzimas capazes de degradar diversos componentes da MEC, principalmente colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanos, componentes essenciais para a integridade cutânea (Klein and Bischoff 2011, Huang 2018). A expressão de MMP1, MMP3 e MMP9 ocorre devido ao aumento do fator de transcrição AP-1, das cascatas inflamatórias, e da degradação da MEC dérmica. Enquanto que a MMP-1 inicia a clivagem de fibrilas de colágeno do tipo I e III, as MMP-3 e MMP-9 as degradam (Fisher, Datta et al. 1996, Brennan, Bhatti et al. 2003, Kim, Ryu et al. 2010). A MMP-2 é majoritariamente inibida pelo inibidor de metaloproteinase do tecido 2 (TIMP-2), e a enzima MMP-9 é inibida por TIMP1 (Crocker, Pagenstecher et al. 2004).

A radiação UVB também é capaz de regular positivamente citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-8 e MCP-3, o que contribui em grau ainda mais expressivo para o fotoenvelhecimento na pele (Kim, Ryu et al. 2010). Em contrapartida, a exposição aos raios UVA e UVB de maneira crônica afeta principalmente compartimentos dérmicos, devido à alta capacidade de penetração de radiação. Nesse sentido, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) se mostra como um importante fator inflamatório e prejudicial ao tecido, bem como a produção de MMP-1, induzida nos fibroblastos dérmicos (Bernerd and Asselineau 1997).

1.3 Envelhecimento cutâneo cronológico

Em contraste com os fatores de envelhecimento extrínsecos e fotoenvelhecimento, a pele que não sofreu exposição solar mostra envelhecimento determinado por fatores cronológicos, nos quais são evidenciados por alterações clínicas, histológicas e fisiológicas que ocorrem na pele, mesmo na ausência da ação dos raios solares. Fatores cronológicos ocorrem em indivíduos mais velhos, afetando a taxa de renovação epidérmica, depuração de substâncias químicas da derme, espessura dérmica, mecanismo de termorregulação, taxa de reconstituição do epitélio após a cicatrização da ferida, responsividade imunológica, dentre outros fatores (Gilchrist 1996). No mesmo sentido, quando a replicação do DNA ocorre de

maneira deficiente, os telômeros continuamente perdem parte de suas sequências, resultando na limitação da capacidade de replicação celular. Uma das principais alterações relacionadas com o envelhecimento na pele é a mudança da matriz no padrão de expressão dos fibroblastos, que permanecem em fase estacionária por um longo período de tempo, induzindo proliferação somente com estímulos, não ocorrendo assim o encurtamento dos telômeros. Contudo, os fatores derivados dos fibroblastos são essenciais para o crescimento padrão e diferenciação dos queratinócitos, devido à perda telomérica (Boukamp 2001, Wlaschek, Tancheva-Poór et al. 2001). As alterações teloméricas também podem atingir as células-tronco residentes em tecidos, e gerar um impacto na capacidade de auto renovação, manter a homeostase e na geração de um ou mais tipos de células especializadas que mantêm e reparam a função do tecidual (Gonzales and Fuchs 2017).

Em indivíduos do sexo feminino, as alterações mostram-se ainda mais acentuadas após a menopausa, onde ocorre o declínio considerável da produção do hormônio estradiol. As principais alterações na pele após tal diminuição incluem: perda e decaimento nas taxas de produção de colágeno, diminuição da elastina, diminuição da função de fibroblastos dérmicos e aumento das atividades enzimáticas das MMPs, resultando em ressecamento cutâneo, aparecimento de rugas, cicatrização prejudicada e diminuição da capacidade antioxidante natural da pele (Lephart and Naftolin 2021). Positivamente, este hormônio está envolvido com a prevenção da diminuição função cognitiva ocasionada pela idade avançada, tratamento para a osteoporose e doenças cardiovasculares (Hugenschmidt, Duran et al. 2021).

1.4 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

Estresse oxidativo e o termo "espécies reativas de oxigênio" (ROS) são utilizados para se referir aos radicais livres (RL) e seus intermediários não radicais. Os RL são estruturas cuja principal fonte é oxigênio molecular, utilizado na mitocôndria em reações envolvendo sua ligação ao NADP⁺, que por sua vez é reduzido a NADPH, e, ao final da cadeia, leva à síntese de H₂O e produção de energia. Durante este processo, ocorre o transporte de quatro elétrons dentro da membrana mitocondrial interna. Contudo, 1 a 2% desses elétrons transportados são perdidos durante este percurso, sendo gerado assim o ânion superóxido (O₂⁻), que,

por conter um ou mais elétrons desemparelhados com elementos eletrônicos incompletos e possui alta reatividade (Podda and Grundmann-Kollmann 2001, Burton and Jauniaux 2011).

As principais ROS são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxila (OH). Além de representar um radical livre nocivo à integridade das células e sistemas vivos, o ânion superóxido é também considerado uma fonte de ROS adicionais, uma vez que através da interação com o peróxido de hidrogênio é gerado o radical hidroxila (Podda and Grundmann-Kollmann 2001, Beak, Lee et al. 2004).

As ROS desempenham um papel importante no envelhecimento da pele. Embora os queratinócitos epidérmicos e as células do sistema imune presentes na pele produzam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias após radiação UV e ferimentos, as células estromais, particularmente os fibroblastos dérmicos, são essenciais na integridade e na estrutura da pele. Dentre suas funções, é importante destacar a participação na síntese de colágeno, produção de citocinas, quimiocinas e, portanto, atuação nas respostas inflamatórias e imunes locais, além de exercerem um papel crítico no envelhecimento da pele (Kähäri and Saarialho-Kere 1997, Wolf, Weinberger et al. 2012, Weiss 2013).

Para proteção fisiológica contra o estresse oxidativo, o fator 2 relacionado ao fator nuclear eritróide (Nrf2) é essencial na manutenção do equilíbrio e homeostase (Ambrozova, Ulrichova et al. 2017). O Nrf2 é um fator de transcrição citosólico, que, sob condições não estressantes, é capturado pela proteína *Kelch-like* associada à ECH (Keap1) e é direcionado para degradação por proteassoma. Em células sob estresse danoso, o Nrf2 é separado da sua proteína inibidora e transportado para o núcleo, onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE), formando heterodímeros com a proteína Maf80. Assim, ARE ativam genes que codificam inúmeras enzimas antioxidantes sendo sua expressão pronunciada em macrófagos e queratinócitos (figura 2) (Holland and Fishbein 2010).

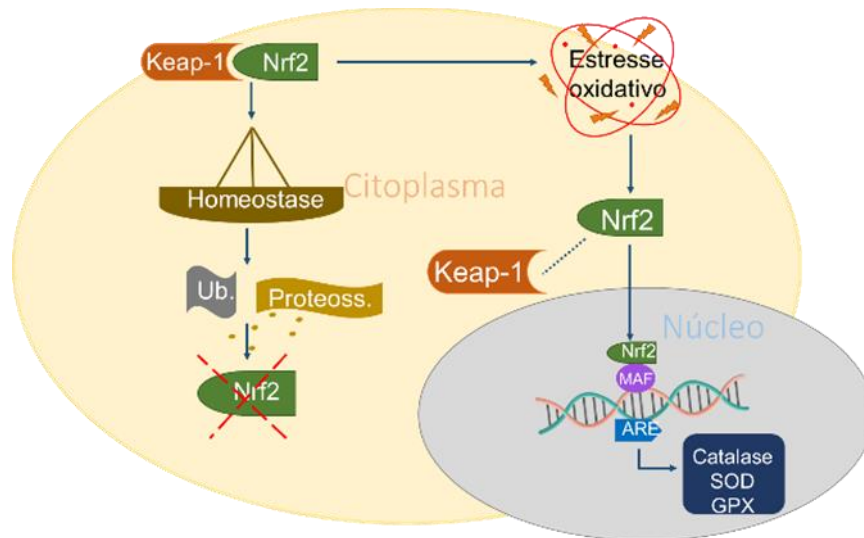


Figura 2. Via de ativação de Nrf2. Sem condições que sugerem estresse oxidativo, o Nrf2 é capturado pela proteína Kelch-like associada à ECH (Keap1) e degradado por proteassomas. Sob estresse oxidativo, o Nrf2 se desagrega da proteína inibidora e adentra o núcleo celular, onde se associa com elementos de resposta antioxidante (ARE), formando assim heterodímeros com a proteína Maf80. Tal processo leva a expressão de genes que codificam para a expressão proteica enzimas antioxidantes como a catalase, SOD e GPX. (Adaptado de: (Ghareghomi, Habibi-Rezaei et al. 2022).

É importante mencionar que as enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPX), são produzidas nos tecidos como a pele, com intuito de evitar processos de exaustão celular (Fischer, Kleszczyński et al. 2013). A enzima antioxidante SOD é capaz de transformar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. São conhecidas diferentes isoformas enzimáticas, onde a enzima SOD1 é encontrada no citosol e no núcleo celular, e dependente de cobre e zinco (Cu, Zn). Já a SOD2, dependente de manganês (Mn²⁺), é encontrada exclusivamente nas mitocôndrias e é responsável por dismutar o superóxido originário da cadeia transportadora de elétrons (Ruhrberg, Hajibagheri et al. 1996, Manchope, Calixto-Campos et al. 2016). A catalase é amplamente expressa na pele, especialmente no estrato córneo (Giacomoni, Declercq et al. 2000, Hellemans, Corstjens et al. 2003, Shin, Rhie et al. 2005, Alfonso-Prieto, Biarnés et al. 2009). A GPX é uma enzima conhecida por cumprir duas tarefas simultâneas: promover a redução do peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e também reduzir de hidroperóxidos de ácidos graxos. São descritas glutaciona peroxidases em humanos, sendo cinco delas selênio-dependentes (Rinnerthaler, Bischof et al. 2015). Durante o envelhecimento, é relatado a diminuição da capacidade antioxidante endógena na pele, seja enzimática

ou não enzimática, tornando a pele de idosos mais vulnerável a agentes externos (Papaccio, D' Arino et al. 2022).

1.5 *Inflammaging*

O termo *inflammaging* é caracterizado por uma inflamação crônica, assintomática e pouco agravante, que ocorre durante o envelhecimento fisiológico e é descrito como um fator patogênico no desenvolvimento de várias doenças associadas, tais como aterosclerose, diabetes e doença de Alzheimer (Goto 2008, Libby, Okamoto et al. 2010, Morales, Farías et al. 2010, Zhuang and Lyga 2014). Em situações de *inflammaging*, são descritos níveis elevados de proteína C-reativa (PCR) e IL-6 (Franceschi, Bonafè et al. 2000, Yap 2018). Na pele, doenças como pênfigo vulgar, herpes, dermatite herpetiforme e lúpus eritematoso sistêmico contribuem com o *inflammaging* cutâneo (Kotnik 2011).

Em adição, a imunidade inata é apontada como um dos principais interventores no processo deste tipo de inflamação (Goto 2008). Os macrófagos e as DCs são coadjuvantes essenciais para a imunidade inata e sua ativação, e, conseqüente inflamação pode ocorrer em várias doenças relacionadas ao envelhecimento (Moore and Tabas 2011). Em geral, as doenças associadas ao envelhecimento mostram aumento dos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . No contexto cutâneo, a IL-1 β regula negativamente o colágeno, diminuindo sua produção e favorecendo sua degradação, contribuindo assim para o envelhecimento prematuro da pele (Honda, Abe et al. 2008, Baugé, Girard et al. 2012).

É importante mencionar também que, na condição de *inflammaging*, há ativação da via do NF- κ B. Aqui, compreende também a ativação das vias MAPK, p38, JNK e ERK, bem como o recrutamento das proteínas c-Fos e c-Jun, que levam a ativação da proteína ativadora 1 (AP-1), resultando na produção de MMP1, 3 e 9 de fibroblastos e de queratinócitos. A AP-1 também inibe o TGF- β , importante na produção de colágeno, levando a uma junção de fatores importantes quando se considera o envelhecimento (Fisher, Datta et al. 1996, Quan, He et al. 2005, Navarrete-Reyes and Montana-Alvarez 2009, Salvioli, Monti et al. 2013).

1.5.1 *Inflammaging* sistêmico e COVID-19 na pele

Atualmente, pode-se considerar o novo corona vírus (SARS-CoV-2), identificado no final do ano de 2019, em Wuhan, na China, um vírus capaz de gerar efeitos sistêmicos e de gravidade em idosos (Chen, Dai et al. 2020). Os sintomas que eram descritos no início da pandemia e antes da vacinação a nível mundial incluem, principalmente, febre, tosse seca e dores no corpo. Em casos mais graves, foi descrito a ocorrência da tempestade de citocinas (*cytokine storm*), relatada como uma condição imunológica marcada pela ativação de células Th1, que secretam excessivamente citocinas pró-inflamatórias como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e IL-6. Em segunda instância, a excessiva produção da citocina TNF- α também ocorre devido à ativação de monócitos, levando, em conjunto, à manifestação de sintomas como linfopenia severa, trombose e alta quantidade de infiltração de células mononucleares em múltiplos órgãos. Tal condição foi relacionada à dificuldade respiratória severa e infecções a nível sistêmico com acometimento de diferentes órgãos, podendo, por fim, levar a óbito (Zhou, Fu et al. 2020, Hu, Huang et al. 2021).

Na COVID-19, existem inúmeros relatos clínicos de manifestações cutâneas estudadas histopatologicamente e molecularmente através de biópsias de pacientes infectados com o vírus e presente dermatose, apesar de ainda não estar claro o envolvimento viral direto neste órgão (Llamas-Velasco, Fraga et al. 2023). O relato mais comum é de aparição de erupções cutâneas (Recalcati 2020), urticária generalizada (Hedou, Carsuzaa et al. 2020), vesículas semelhantes à varicela (Marzano, Genovese et al. 2020), erupções exantemáticas (Najarian 2020), lesões cutâneas eritematosas (Mahé, Birckel et al. 2020), urticariformes e vesiculares (Gianotti, Veraldi et al. 2020), e, curiosamente, reativação do Herpes simplex oral tipo 1 (Hedou, Carsuzaa et al. 2020). A maioria das manifestações cutâneas encontradas nos trabalhos supracitados foram observadas no tronco dos pacientes, com idade entre 8 e 84 anos, sem prevalência de gênero. No entanto, foi concluído mais recentemente que lesões vasculopáticas e urticariformes parecem ser as mais evidentemente relacionadas à infecção por SARS-CoV-2 (Llamas-Velasco, Fraga et al. 2023).

Assim, aprimorar a investigação de mecanismos imunológicos inflamatórios e moleculares na pele de pacientes com a COVID-19, pode contribuir para a formulação de conclusões mais precisas e possíveis melhores caminhos para tratamento e intervenções medicamentosas para os pacientes com manifestações cutâneas.

1.6 Imunossenescência e imunidade inata

Devido aos hábitos e estilo de vida, vem aumentando a expectativa de vida como fenômeno global. Foi divulgado uma estimativa numérica pela Organização Mundial da Saúde (OMS), apontando que indivíduos com 60 anos ou mais, no ano de 2020, era de aproximadamente 1 bilhão de pessoas e a previsão para o número de pessoas com 80 anos ou mais deverá triplicar entre 2020 e 2050 (OMS 2022). Considerando o crescente envelhecimento populacional, os desafios que surgiram quanto às alterações imunológicas em idosos estão associados a inflamação sistêmica crônica de baixo grau (*inflammaging*) e o declínio progressivo da competência do sistema imunológico inato e adaptativo (imunossenescência) (Franceschi, Bonafè et al. 2000). A pandemia causada pela COVID-19 evidenciou como os idosos podem estar mais vulneráveis a infecções e o quanto a imunossenescência torna-se um agravante (Chen, Dai et al. 2020). Nesse sentido, é interessante avaliar a capacidade de resposta aos estímulos de resposta inata, como pela ativação dos receptores do tipo Toll (TLRs).

Os TLRs são proteínas transmembranares localizadas tanto na membrana plasmática, quanto nos endossomos de diversos tipos celulares. Possuem reconhecidas funções no sistema imunológico, uma vez que atuam como sensores para patógenos bacterianos, virais e fúngicos. Esses receptores são capazes de reconhecer diferentes patógenos por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de microorganismos ou por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e, posteriormente, de iniciar uma resposta imune (Takeda, Kaisho et al. 2003). Os TLRs são essenciais na associação entre a imunidade inata e adaptativa. Atualmente, há dez TLRs em células humanas (Boozari, Butler et al. 2019). Os TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10 são geralmente expressos na superfície celular (membrana) e os TLR3, 7, 8 e 9 são expressos em membranas do endossomo e do lisossomo (Nahum, Dadi et al. 2012, O'Neill, Golenbock et al. 2013, Taguchi and Mukai 2019).

O TLR3, é capaz de reconhecer e responder ao estímulo de vírus de dupla fita de RNA (dsRNA), enquanto que o TLR4 é ligante principalmente para lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que é um dos principais componentes encontrados na membrana externa de bactérias Gram-negativas, mas também reconhece algumas proteínas estruturais de vírus e polissacarídeos fúngicos (Kawai and Akira 2011). A ativação do TLR3 leva a uma cascata de sinalização única, uma vez que vírus de RNA dupla fita é conhecido por induzir a síntese de interferons tipo I (IFN- α/β), que atuam como produtos antivirais e desempenham atividades imunoestimuladoras, incluindo a transcrição de alguns genes induzíveis por IFN e maturação de DCs. O TLR4 inicia múltiplos processos de sinalização e expressão do fator de transcrição NF- κ B, levando a conseguinte produção de citocinas pró-inflamatórias (Takeda, Kaisho et al. 2003, Vaure and Liu 2014, Takeda and Akira 2015). Os receptores do tipo Toll 7 e 8 podem ser ambos ativados em resposta a estímulos por vírus com material genético constituído por RNA de cadeia simples (ssRNA). Em células do sistema imune humanas, o TLR7 é expresso principalmente em células dendríticas plasmocitóides (pDC), onde, após sua ativação, leva à produção de IFN- α e induz proliferação de linfócitos B e secreção de anticorpos. O TLR8, apesar de também ser ativado por ssRNA, é expresso principalmente em monócitos e células dendríticas derivadas de células hematopoiéticas mieloides. Neste caso, sua ativação configura a resposta de um perfil mediado por linfócitos T Helper 1 (Th1). Agonistas de TLR7/8 recebem atenção quando se fala em estímulos virais (Thimme, Wieland et al. 2003, Bekeredjian-Ding, Roth et al. 2006, Embrechts, Herschke et al. 2018).

O nosso grupo de pesquisa vem estudando a sinalização via TLR7/TLR8 (dímero CL097) em vários modelos, para restaurar a resposta de IFN tipo I em infecções virais como HIV-1 (Cardoso, Pereira et al. 2013, Lima, Oliveira et al. 2017, Pietrobon, Yoshikawa et al. 2022), doenças cutâneas como o líquen plano (Domingues, de Carvalho et al. 2016, Domingues, Pietrobon et al. 2019) e síndrome de Sezary (Manfrere, Torrealba et al. 2016). O estudo envolvendo envelhecimento, no entanto, ainda não foi explorado pelo nosso grupo.

1.7 Resveratrol

Considerando que o envelhecimento e a imunossenescência têm como fator desencadeante o perfil oxidativo, é interessante buscar compostos naturais com potencial antioxidante para modular o processo oxidativo. O Resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxiestilbeno) é uma fitoalexina polifenólica, isolado pela primeira vez em 1940 das raízes da espécie vegetal *Veratrum grandiflorum* e novamente em 1963, das raízes da espécie *Polygonum cuspidatum* (Timmers, Auwerx et al. 2012). Naturalmente, o Resv atua protegendo frutas e bagas contra infecções fúngicas e radiação UV, podendo ser encontrado principalmente em uvas, amendoins, mirtilo, pinhão e pistache (Lançon, Michaille et al. 2013).

O resveratrol (Resv) possui ação contra oxidação, câncer, inflamação e até ação preventiva na Doença de Alzheimer e em doenças autoimunes (Lu, Zahid et al. 2008, Gatouillat, Balasse et al. 2010, Pasinetti, Wang et al. 2015, Wang, Li et al. 2016, Zhou, Mou et al. 2018). Recentemente, nosso grupo observou que o Resv é capaz de atenuar a ativação de neutrófilos e diminuir a liberação de redes extracelulares (NETs) de neutrófilos em pacientes com sintomas graves na COVID-19 (de Souza Andrade, Leal et al. 2022). Esses dados salientam o potencial antioxidante do Resv e, que é possível ser utilizado como terapia adjuvante para atenuar a inflamação gerada em infecções virais, visando a melhora do desfecho da doença.

A principal via de ação no envelhecimento é ativação das sirtuínas (SIRT), principalmente a sirtuina 1 (SIRT1), onde é mostrado um papel regulador, aumento de longevidade, reparo de DNA, ação anti-inflamatória e regulação mitocondrial (Blander and Guarente 2004, McCubrey, Lertpiriyapong et al. 2017). O Resv mostrou também potencial regulador aumentando a expressão de Nrf2 e da heme oxigenase-1 (HO-1), enzima com potentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (figura 3) (Chen, Jang et al. 2005).

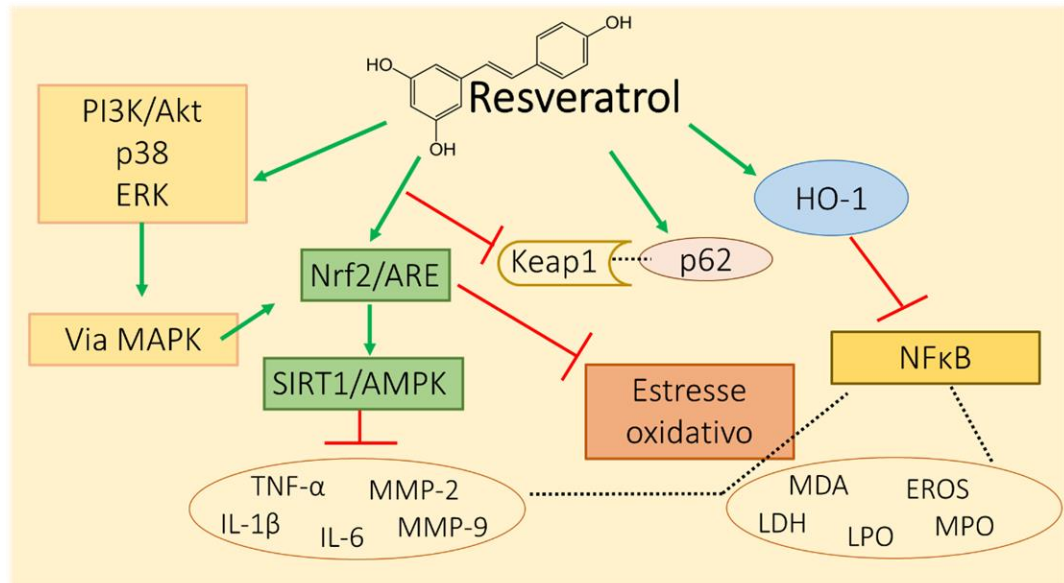


Figura 3. As vias de ação do resveratrol. A principal via de ação do Resv se refere ao aumento da expressão de Nrf2, basicamente por ser capaz de inibir sua ligação com Keap-1, o que promove sua translocação para o núcleo, e, conseqüentemente, diminui o estresse oxidativo e a produção de citocinas pró-inflamatórias, com auxílio de SIRT1/MAPK. Outras vias envolvidas são as de NFκB, onde sua inibição acontece através da ativação da proteína heme oxigenase 1 (HO-1) (Farkhondeh, Folgado et al. 2020).

Este composto possui também eficácia em mecanismos de sinalização celular envolvendo fotoenvelhecimento, proteínas quinases, diminuição da ativação de vias relacionadas a ativação de NFκB e diminuição das MMPs (Chen, Li et al. 2006). Considerando o contexto do envelhecimento e a imunossenescência, foi mostrado que o Resv pode atuar como um antioxidante importante em PBMCs de idosos e de indivíduos de meia-idade estimuladas com H_2O_2 , sugerindo que a via de atuação deste composto fenólico ocorre através da sinalização da via MAPK (Santos, Franco et al. 2021).

Dessa forma, a investigação de genes diferencialmente expressos na pele de indivíduos jovens e idosos, e a investigação de fatores relacionados ao estresse oxidativo e inflamação induzida por agonistas de TLR3, TLR4 e TLR7/8 em PBMCs podem levar a melhor compreensão no controle das infecções em idosos e da imunossenescência. No mesmo sentido, compreender mecanismos inflamatórios da COVID-19 na pele elucidam achados acerca do *inflammaging* e mecanismos virais com repercussão sistêmica.

2. OBJETIVOS

Avaliar a expressão de fatores antioxidantes e antivirais no envelhecimento cutâneo cronológico, no fotoenvelhecimento e na infecção aguda por SARS-Cov-2. Além disso, avaliar o potencial modulador *in vitro* do Resv quanto a produção de citocinas e expressão transcricional estimulados por agonistas de TLRs por PBMCs de jovens e idosas.

2.1 Objetivos específicos

Avaliar na pele cronologicamente envelhecida:

- Expressão transcricional de fatores antioxidantes (catalase, SOD2, GPX1), antivirais (STING, MxA, IRF3 e IRF7) e genes relacionados ao reparo tecidual na pele (TIMP1 e FGF2);
- Expressão proteica por imunohistoquímica de Nrf2 e IRF3.

Investigar em pele de pacientes com COVID-19 que vieram a óbito:

- Expressão de genes alterados (aumentados e diminuídos) entre grupos amostrais;
- Expressão proteica por imunohistoquímica em lâminas de pele.

Analisar em PBMCs:

- O efeito do Resv na expressão transcricional de PBMCs estimuladas com agonistas de TLR3, TLR4 e TLR7/8;
- O efeito do Resv quanto a produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras no sobrenadante de culturas estimuladas com agonistas de TLR3, TLR4 e TLR7/8.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

3.1.1 Estudo do envelhecimento cutâneo e celular

Foram recrutadas voluntárias sadias para as coletas, apenas do sexo feminino com faixa etária de 21 a 30 anos (n=10, grupo adulto) e com idade entre 60 e 77 anos (n=10, grupo idoso). Como critérios de exclusão, não participaram do estudo gestantes e lactantes, portadoras de doenças nos rins e/ou no fígado, diabetes tipo 1 e 2, doenças envolvendo colágeno, melanoma, positividade para os vírus HIV ou da hepatite C, uso de corticoide tópico no local e uso de imunossupressores. Todos os indivíduos foram informados do conteúdo da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob número CAAE 16145719.8.0000.0065.

3.1.2 Casuística – Estudo da pele na infecção por COVID-19

Para realização do transcriptoma, foram selecionadas amostras cutâneas de pacientes que foram a óbito devido a gravidade pela infecção do SARS-CoV-2 (n=8), enquanto internados na Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital das Clínicas e coletadas pelo Serviço de Verificação de Óbito do HCFMUSP. Foram selecionadas amostras de pacientes caucasianos, de ambos os sexos, com idade entre 35 e 70 anos, que evoluíram a óbito comprovadamente por complicações pela COVID-19, documentadas por teste PCR e dados clínicos. Somente foram selecionadas amostra de pele por autópsias com tempo post-mortem inferior a 20 horas, todas realizadas por punch na mesma região torácica (n=6). O projeto possui colaboração com o Departamento de Patologia, com pesquisadores associados: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, Dr. Amaro Nunes Duarte Neto e pelo Departamento de Dermatologia da FMUSP, e, foi vinculado ao projeto de pesquisa “Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias”, que apresenta aprovação junto ao Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisas (CAPPesq) do HCFMUSP, sob número de parecer 3.983.577. As

amostras controle (n=5) para comparação com amostras COVID-19 foram as mesmas coletadas e utilizadas no estudo de envelhecimento do presente estudo, em 2019, com a inclusão de dois indivíduos do sexo masculino (CAAE 16145719.8.0000.0065).

3.2 Coleta das amostras

3.2.1 Biopsias de pele para estudo de envelhecimento cronológico: As biópsias de pele foram coletadas por “punch” de 6 mm de diâmetro realizadas na região lombar terminal. A escolha da região coletada foi devido à ausência de fotoexposição no local. O tecido foi coletado após antissepsia com solução de clorexidina 0.5% alcoólica e aplicação de anestesia local infiltrativa. O tecido coletado foi dividido em duas partes: uma parte foi armazenada em solução de formol a 10% e emblocada em parafina com menos de 24 horas após a coleta e a outra parte da amostra, em solução de RNA later (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO/USA), sendo estocada a -80°C, por 30-60 dias.

3.2.2 Biopsias de pele para estudo do fotoenvelhecimento: As biópsias foram coletadas utilizando por “punch” de 6 mm de diâmetro, na região do antebraço. A escolha da região coletada foi devido à constante presença de fotoexposição no local. O tecido foi coletado após antissepsia com solução de clorexidina 0.5% alcoólica e aplicação de anestesia local infiltrativa. O tecido coletado foi armazenado em solução em solução de RNA later (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO/USA), sendo estocado a -80°C, por 30-60 dias.

3.2.3 Amostra sanguínea: Aproximadamente 10 mL de sangue foi coletado em tubo heparina e processado imediatamente após a coleta. Não houve a necessidade de as voluntárias permanecerem em jejum.

3.3 PCR em tempo real (qPCR)

Com o intuito de analisar os transcritos para fatores antioxidantes e antivirais nas amostras de biopsias de pele para estudo do envelhecimento, as amostras de

pele foram preservadas solução em solução de RNA later (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO/USA) e processadas utilizando Tissue Ruptor (Qiagen). Para extração do RNA, foi utilizado o kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de RNA foram mensurados com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific). O cDNA foi sintetizado somente em amostras que apresentavam concentração a partir de 5 ng/ul de amostra, tanto para amostras de pele, quanto para amostras celulares. A reação de amplificação em tempo real foi utilizando a solução SYBR® Green (Applied Biosystems) e os primers sense e anti-sense para os genes alvos e controle interno GAPDH (tabela 1). A amplificação foi realizada no aparelho 7500 (Applied Biosystems) e a análise dos resultados realizada no programa 7500 Software v2.0.6 (Applied Biosystems).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para qPCR de amostras de pele e de PBMCs.

Primer	Sequência	Empresa
TIMP1	F: ACTTCCACAGGTCCCACAAC R: CACTGTGCATTCTCACAGC	Thermo Fisher Scientific
SOD2	F: GCCCTGGAACCTCACATCAA R: TCAGGTTGTTACGCTAGGCC	Thermo Fisher Scientific
GPX-1	F: TTGAGAAGTTCCTGGTGGGC R: CGATGTCAGGCTCGATGTCA	Thermo Fisher Scientific
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTTCGGAGT R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	Thermo Fisher Scientific
IRF3	F: AGAGGCTCGTGATGGTCAAGGTT R: AGAGTGGGTGGCTGTTGGAAATG	Thermo Fisher Scientific
IRF7	F: TGGTCCTGGTGAAGCTGGAA R: GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG	Thermo Fisher Scientific
MxA	F: AAGCTGATCCGCCTCCACTT R: TGCAATGCACCCCTGTATACC	Thermo Fisher Scientific
STING	F: ATATCTGCGGCTGATCCTGC R: GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT	Thermo Fisher Scientific
CATALASE	F: CTCCGGAACAACAGCCTTCT R: GAATGCCCGCACCTGAGTAA	Thermo Fisher Scientific
FGF2	F: GTCTGTGTGGCTGTATGGAGAA R: TTGGGGTCATGGCAAACCTGT	Thermo Fisher Scientific

SIRT1	F: TGAATATGCCAACTTTGCTG R: GGGTGGCAACTCTGACAAAT	Thermo Fisher Scientific
--------------	----------------------------------------------------	--------------------------

F= Sense (forward). R= Anti-sense (reverse).

3.4 Imunohistoquímica e análise das lâminas

A reação foi realizada a partir de cortes histológicos de 4µm de espessura, embebido em parafina e colhido em lâminas previamente preparadas com solução adesiva de 3 amino-propyltriethoxy-silane (Sigma). Os cortes histológicos foram desparafinizados por banhos em xilol de 20 e 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram hidratados com concentrações decrescentes de álcool sendo banhados primeiramente em álcool a 100%, depois em álcool a 95% e por fim em álcool a 70%, com posterior lavagem em água corrente por cinco minutos. O bloqueio de peroxidase endógena tecidual foi feito em câmara escura, com três incubações em peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos cada, sendo as lâminas lavadas em água corrente durante cinco minutos e submetidas a tratamento para posterior exposição antigênica. A recuperação antigênica foi feita a 95°C em banho maria por 20 minutos, sendo imersas na solução *Target Retrieval Solution* (DakoCytomation, CA, USA) durante 20 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por cinco minutos cada e submersas em solução salina tamponada (PBS), com pH 7.4. A seguir, foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação em solução de leite desnatado a 10% durante 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na tabela 2, separadamente diluídos com meio (albumina de soro bovino - BSA 1%, acrescida de azida sódica 0,1% em tampão PBS, pH 7.4) por 24 horas a 4°C. Os controles negativos das reações foram feitos com a omissão dos anticorpos primários substituído por PBS. A montagem das lâminas foi realizada com resina Permunt (ThermoScientific).

Para analisar as lâminas, estas foram escaneadas e digitalizadas pelo Scanner de lâminas “Aperio Scan-scope Cs” (Aperio Technologies, Vista, CA) no aumento de 40x. Depois, foram analisadas no software Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc, Bethesda, Maryland), através da quantificação da área marcada positivamente e dividida pela área total medida na epiderme ou na derme.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para marcação em imunohistoquímica na pele.

Anticorpo	Tipo de anticorpo	Diluição	Empresa
Nrf2	Anticorpo primário - Rabbit	1:100	Abcam
IRF3	Anticorpo policlonal IGg - Rabbit	1:100	Santa Cruz
FGF2	Anticorpo primário - Rabbit	Em padronização	Abcam
TIMP1	Anticorpo primário - Rabbit	Em padronização	Abcam
MMP-3	Anticorpo primário - Rabbit	Em padronização	Abcam

3.5 Cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e estímulo com agonistas de TLRs

Após a coleta do sangue com heparina, as células foram separadas por gradiente de densidade, utilizando solução de Ficoll-Paque (GE Healthcare). Foram realizados dois tipos de culturas com as PBMC: para ensaios envolvendo a análise transcricional (qPCR), 1.10^6 células por poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning Costar, Merck) por 4 horas. Em outra placa, desta vez com finalidade de avaliar a produção de citocinas, foram cultivadas 2.10^5 células por poço em placa de 96 poços (Corning Costar, Merck), por 24h horas. Em ambas as situações, as células foram plaqueadas em meio de cultivo RPMI suplementado 5% de soro AB (Sigma-Aldrich) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco™). As culturas foram incubadas a 37°C e com CO₂ a 5%, com o agonista de TLR4 (lipopolissacarídeo, LPS- 1 µg/mL - InvivoGen - San Diego, Califórnia, EUA), ou com agonista de receptor TLR3 (POLY I:C - 10 µg/mL, InvivoGen EUA), ou com agonista de receptor TLR 7 e 8 (CL097 - 2,5 µg/mL, InvivoGen EUA), com objetivo de mimetizar infecção bacteriana (TLR4) e virais (TLR3 e TLR7/8). Além da incubação com os agonistas de TLRs, foi também adicionado em algumas situações de cultura celular a presença do Resv (100 µM - Sigma-Aldrich), bem como o seu veículo, que, neste caso, foi a acetona (Sigma-Aldrich).

No ensaio de análise dos transcritos, o RNA foi extraído após as 4 horas de cultura e armazenado a -80°C para posterior ensaio RT-PCR. Para o ensaio de análise do sobrenadante celular, os sobrenadantes das diferentes situações foram coletados e armazenado em freezer -20°C. A melhor concentração dos compostos, bem como o tempo de incubação, foi baseada em testes de padronização realizados

para este estudo, mas também em publicações previamente realizadas pelo nosso grupo (Cardoso, Pereira et al. 2013, Lima, Oliveira et al. 2017, de Souza Andrade, Leal et al. 2022).

3.6 Viabilidade celular em PBMCs

Com a finalidade de testar a citotoxicidade dos estímulos, do Resv e da acetona (nas concentrações supracitadas no item 3.5), as PBMCs foram incubadas por 24 horas com os compostos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) para posterior incubação destas com o marcador de viabilidade LIVE/DEAD (Invitrogen). Após adição deste, as células foram incubadas por 30 minutos, lavadas mais uma vez com PBS e fixadas em uma solução com formaldeído a 1%. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo (LSR Fortessa, BD). A aquisição das amostras foi de 300.000 eventos e os dados foram analisados no programa FlowJo X 10.0.6.

3.7 Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes de culturas de PBMC tratadas com o Resv e estímulos foram analisadas quanto a presença de TNF- α , CCL2, CCL5, IL-1 β , IL-10 e IFN- γ pela técnica de citometria de fluxo CBA (Cytometric bead array BDBioscience), em citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante. Abaixo, na tabela 3, estão descritos os limites mínimos de detecção de cada kit utilizado.

Tabela 3 – Painel com limite mínimo de detecção de citocinas

Citocina	Limite de detecção	Empresa
TNF- α	1,2 pg/mL	BD Bioscience
CCL2	1,3 pg/mL	BD Bioscience
CCL5	0,002 pg/mL	BD Bioscience
IL-1 β	2,3 pg/mL	BD Bioscience
IL-10	0,13 pg/mL	BD Bioscience
IFN- γ	1,8 pg/mL	BD Bioscience

3.8 Extração de RNA, sequenciamento e análises transcriptômica em amostras cutâneas COVID-19

As amostras de pele foram processadas utilizando Tissue Ruptor (Qiagen) e a extração de RNA do tecido coletado foi realizada utilizando o Kit RNeasy Plus (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade e quantificação das amostras do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento TapeStation (Agilent). A construção da biblioteca para sequenciamento das amostras foi preparada utilizando os RNAs purificados, que foram ligados com adaptador RNA 3' e, em seguida, com um adaptador RNA 5'. Todas as bibliotecas obtidas após o processamento das amostras foram reunidas, carregadas e sequenciadas na plataforma NextSeq, para gerar os dados a serem analisados utilizando ferramentas computacionais. Estas etapas, com exceção da extração do RNA, foram realizadas no laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), da Rede PREMiuM da FMUSP.

As sequências de leitura oriundas do sequenciamento de RNA foram submetidas à análise de qualidade com o programa FASTQC. Em seguida, foram alinhadas ao genoma humano (assembly GRCh38.p13 release 103), utilizando-se o programa SUBREAD e contadas com o programa FEATURECOUNTS. A detecção de amostras *outliers*, normalização, realização de testes estatísticos e identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs), foram realizadas utilizando-se o pacote R DESEQ2 do repositório Bioconductor. Os valores de p foram submetidos à correção pelo método de Benjamini-Hochberg. Os genes foram considerados diferencialmente expressos para valores de $p\text{-adj} \leq 0,05$ e valores absolutos de *fold-change*, $FC \geq 1,5$. Os genes diferencialmente expressos, por sua vez, foram submetidos a análises de representatividade de vias com o programa ENRICHR e as análises de enriquecimento de vias moleculares com o pacote R FGSEA. Em ambos os casos, as análises foram utilizadas os bancos de vias moleculares REACTOME. Finalmente, as redes gênicas foram construídas com o programa CYTOSCAPE.

As análises de Bioinformática apresentadas no presente projeto foram realizadas através de colaboração com o pesquisador Dr. Frederico Moraes Ferreira,

do Laboratório de Investigação Médica, LIM-50, do Departamento de Patologia da FMUSP.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados no software GraphPad Prism 9. As comparações entre grupos amostrais foram realizadas utilizando o teste estatístico não paramétrico *Mann-Whitney* para dados não pareados. Para dados pareados, foi utilizado o teste *Wilcoxon*. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Características das voluntárias envolvidas no estudo do envelhecimento cutâneo cronológico

Foram recrutadas 20 voluntárias, sendo 10 jovens (média de 25,3 anos de idade) e 10 idosas (média de 67,5 anos de idade). A idade, por ser um fator determinante para o estudo, foi detalhada conforme confere as tabelas 4 e 5. Todas as voluntárias foram do sexo feminino, devido a interferência hormonal altamente correlacionada com o envelhecimento na pele. A classificação de fototipo de todas as voluntárias foi realizada utilizando a escala de fototipos de Fitzpatrick (Fitzpatrick 1975). Recrutamos voluntárias com fototipo máximo IV, uma vez que a pele negra apresenta padrões diferentes de envelhecimento, maior conteúdo lipídico intercelular e maior proteção contra o fotoenvelhecimento, devido à maior concentração de melanina (Robinson 1999).

Tabela 4 – Características do grupo amostral jovem

Voluntária	Idade	Uso medicamento	Doença	Fototipo	IMC	Obs.
Jovem - 1	25	Anticoncepcional lumi	Não	II	24,78	-
Jovem - 2	26	Não	Não	III	21,09	DIU mirena
Jovem - 3	27	Não	Não	II	27,24	-
Jovem - 4	22	Anticoncepcional lumi	Não	III	21,63	-
Jovem - 5	21	Não	Não	IV	29,03	-
Jovem - 6	26	Não	Não	II	24,73	-
Jovem - 7	26	Anticoncepcional Diclin	Não	II	21,51	-
Jovem - 8	21	Não	Não	IV	24,61	Faz uso de ômega-3 “1 cápsula/dia”
Jovem - 9	29	Não	Não	IV	19,63	-
Jovem - 10	30	Não	Não	IV	22,23	Faz uso de ômega-3 “1 cápsula/dia”

Tabela 5 – Características do grupo amostral idoso

Voluntária	Idade	Uso medicamento	Doença	Fototipo	IMC	Obs.
Idosa - 1	67	Sinvastatina	Hipertensão controlada	II	29,62	Faz uso de vitamina D 1000U/dia

Idosa - 2	65	Não	Não	III	25,50	Faz uso de polivitamínico
Idosa - 3	73	Carvedilol	Hipertensão controlada	III	23,24	Faz uso de vitamina D
Idosa - 4	63	Rosuvastatina	Labirintite	III	34,60	Uso preventivo
Idosa - 5	64	Não	Não	III	27,48	-
Idosa - 6	72	Não	Não	II	25,04	-
Idosa - 7	60	Não	Não	IV	29,05	-
Idosa - 8	71	Não	Não	III	25,71	-
Idosa - 9	63	Tamoxifeno	Não	IV	23,56	-
Idosa - 10	77	Ablok, corus	Hipertensão controlada	II	33,67	Faz uso de cartilagem VO

4.2 Avaliação dos dados transcricionais na pele cronologicamente envelhecida

Para avaliar o perfil de expressão de fatores antioxidantes e oxidantes no envelhecimento cronológico, sem o efeito de raios UV, foram realizadas biopsias de pele em região não fotoexposta, e submetidos em ensaios de PCR em tempo real. Na Figura 4, pode-se observar que a expressão de fatores antioxidantes, GPX-1 (glutathiona peroxidase 1), SOD-2 (superóxido dismutase 2) e catalase, foram similares entre os grupos, sugerindo que a via de Nrf2 não parece se alterar de acordo com a idade. Quanto aos fatores antivirais, MxA não se alterou, mas houve uma diminuição do IRF3 (fator regulador de interferon-3) em idosas, apesar do aumento de STING (estimulador de genes de interferon). Já a expressão de TIMP1 (inibidor de metaloproteinases 1), um reparador do efeito de metaloproteinases (MMPs), foi aumentado no grupo amostral de pele das idosas, como também o FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos 2), em relação ao grupo de jovens (figura 4).

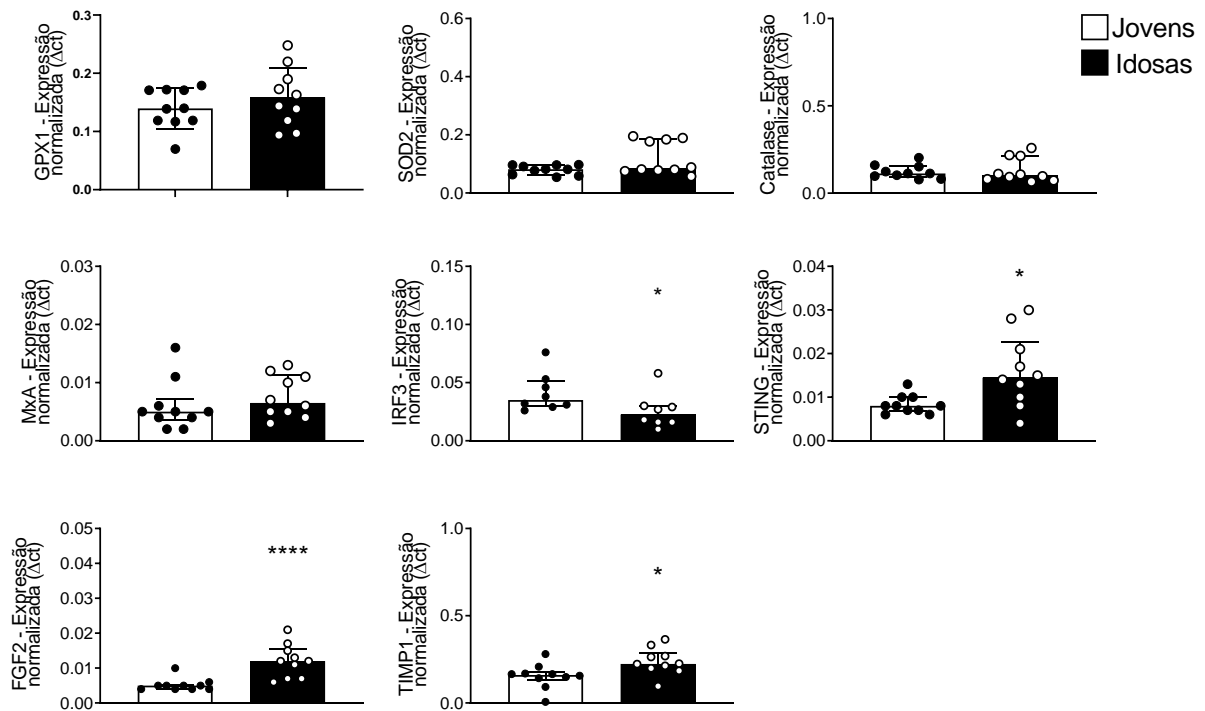


Figura 4. Perfil transcricional de envelhecimento cutâneo cronológico. Ambos grupos amostrais representam biópsias de pele de uma região não fotoexpostas (região glútea, sem exposição a raios UV). Os gráficos mostram a expressão gênica constitutiva de genes relacionados a respostas antioxidantes (GPX-1, SOD-2, Catalase), antivirais (MxA, IRF3, STING) e moduladoras (TIMP1 e FGF2) de voluntárias sadias jovens e voluntárias sadias idosas por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH. N=10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste não pareado de *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

4.2.1 Avaliação proteica de alvos diferencialmente expressos em pele envelhecida cronologicamente

O Nrf2, que coordena a maioria das respostas antioxidantes, inclusive aquelas mediadas por enzimas como GPX-1, SOD2 e catalase (Zhang, Zheng et al. 2022), foi avaliado através da marcação por imunohistoquímica na pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas a expressão proteica deste fator nuclear, analisado por porcentagem de área marcada da epiderme e da derme (figura 5). Não houve diferença estatística quando comparamos as regiões epidérmicas e dérmicas de jovens e idosas não fotoexpostas. No entanto, não foi realizada a comparação de pele de idosas não fotoexpostas com aquelas que sofreram radiação UV, o que poderia fornecer dados interessantes.

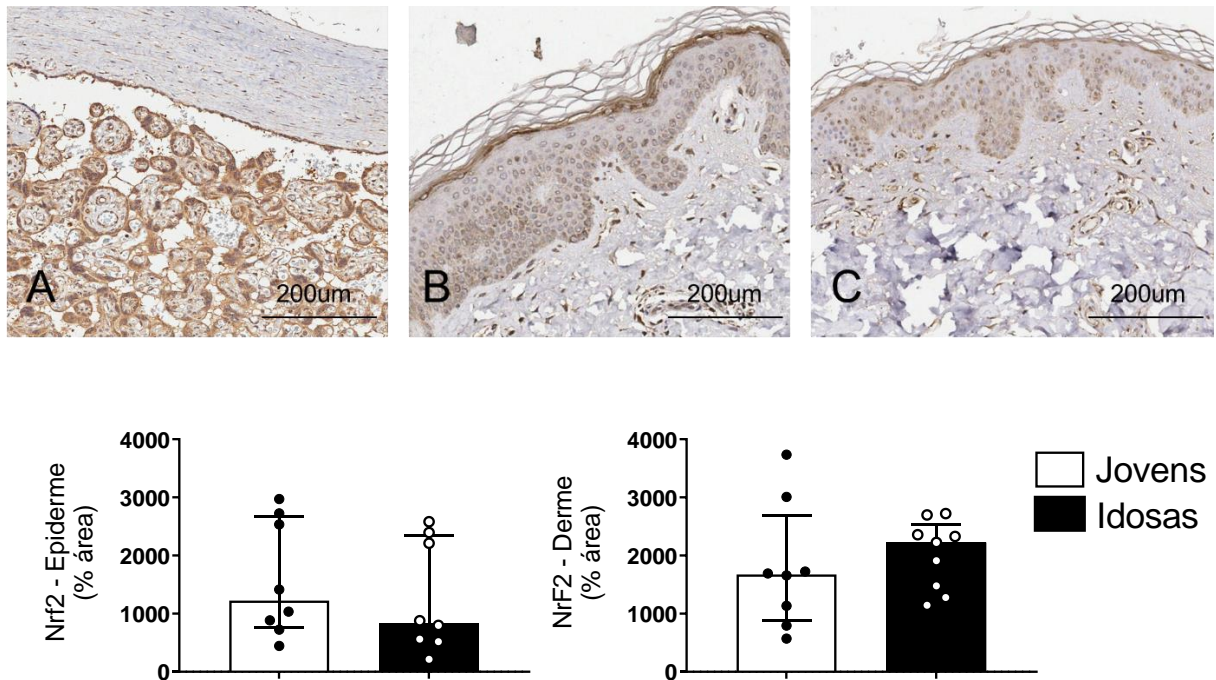


Figura 5. Expressão de Nrf2 em pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas. **A** = Controle positivo em placenta humana, aumento 200 µm; **B** = representativo da pele do grupo de jovens não fotoexpostas. Aumento 200 µm (N= 8); **C** = representativo da pele do grupo de idosas não fotoexpostas (N= 9). Os gráficos mostram valores percentuais da área marcada pelo anticorpo Nrf2 na epiderme e na derme, da pele de mulheres jovens e idosas. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil.

Com o objetivo de avaliar se a diferença transcricional observada para o alvo IRF3 se confirma com a expressão proteica na pele, foi realizado o ensaio imunohistoquímico, na pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas.

A Figura 6 mostra que há aumento da expressão de IRF3 na epiderme de mulheres idosas em comparação com as jovens. É curioso notar que, na expressão transcricional, tal fator está diminuído nas idosas (Figura 4). Contudo, a expressão proteica está elevada neste grupo (Figura 6). Chama atenção a importância de analisar a correlação gênica-proteína, considerando que na pele há uma questão epigenética que pode influenciar na metilação de fatores de transcrição, o que pode levar ao aumento da expressão da proteína.

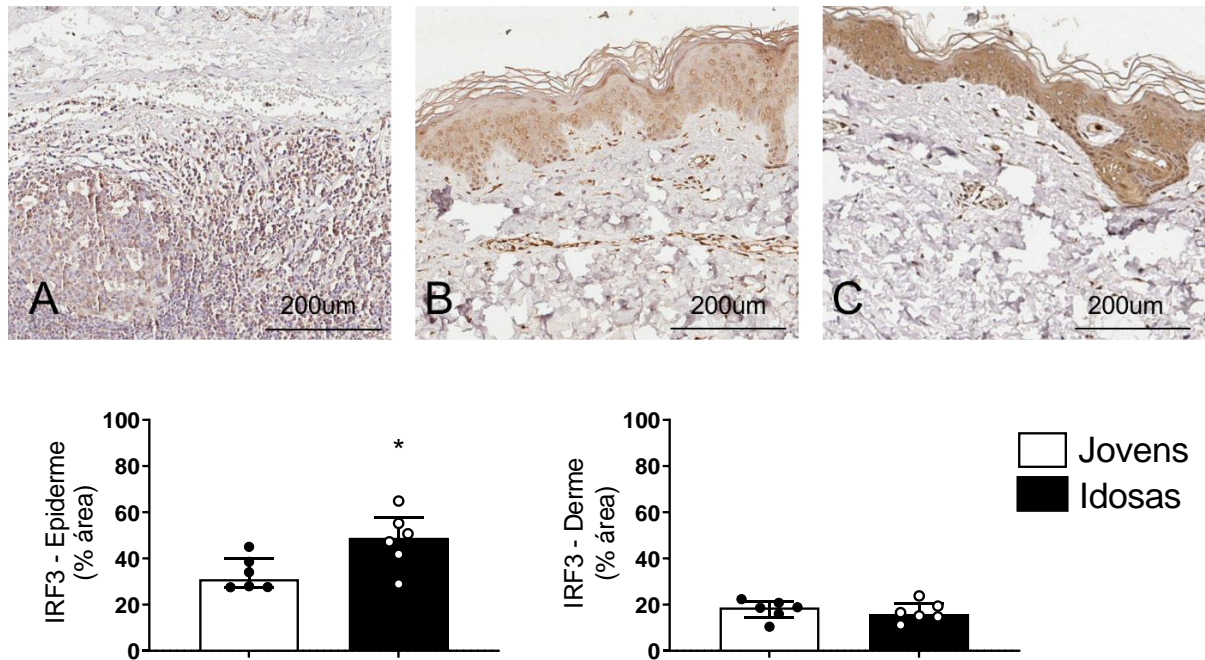


Figura 6. Expressão de IRF3 em pele de mulheres jovens e idosas não fotoexpostas. **A** = Controle positivo em tonsilas palatinas humanas, aumento 200 µm; **B** = representativo da pele do grupo de jovens não fotoexpostas. Aumento 200 µm (N= 6); **C** = representativo da pele do grupo de idosas não fotoexpostas (N= 6). Os gráficos mostram valores percentuais da área marcada pelo anticorpo IRF3 na epiderme e na derme, da pele de mulheres jovens e idosas. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste não pareado de *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$.

4.3 Comparação entre dados transcricionais na pele no envelhecimento cutâneo: intrínseco e fotoenvelhecimento

Sabe-se que o envelhecimento natural, causado por inúmeros processos celulares naturais e genéticos do corpo, é a primeira causa do envelhecimento cutâneo. No entanto, o fotoenvelhecimento representa a segunda maior causa, sendo a exposição ao sol ao longo da vida um aspecto que acelera consideravelmente o processo (Jiang, Zhou et al. 2022).

Em colaboração com o estudo realizado pela Dra. Marcelle Nogueira, que, também estudou o envelhecimento na pele, porém de amostras coletadas de uma região corpórea fotoexposta (antebraço), foram cedidas 10 amostras biológicas, sendo todas de voluntárias idosas com idade entre 60 e 73 anos (média de 65,7 anos de idade) e fototipo de Fitzpatrick II a III. Para pareamento dos dados com o que já estávamos estudando devido a interferência hormonal, todas as voluntárias foram também do sexo feminino e todas idosas. A comparação aqui ocorreu

somente entre voluntárias idosas, com o intuito de avaliar a comparação entre os dois tipos de envelhecimento.

Na figura 7, é possível observar que as enzimas antioxidantes GPX-1, catalase e também o fator inibidor das metaloproteínas TIMP1 mostram maior expressão no grupo fotoexposto.

Avaliando alvos antivirais como MxA, IRF-3 e STING, foi observado aumento da expressão do fator regulador de interferon (IRF3) nas amostras fotoexpostas. É interessante notar, que, o grupo que não fotoexposto mostrou diminuição de IRF3 (figura 7), e, que, na fotoexposição, há uma reversão.

O alvo fator de crescimento de fibroblastos beta (FGF2) mostrou-se mais expresso na pele de idosas fotoexpostas do que em comparação à pele cronologicamente envelhecida. Os dados mostram que há um diferente perfil de expressão no envelhecimento cutâneo, sendo que na condição cronológica, há uma diminuição de fator antiviral IRF3, que é acentuado com a fotoexposição, em associação com fatores antioxidantes.

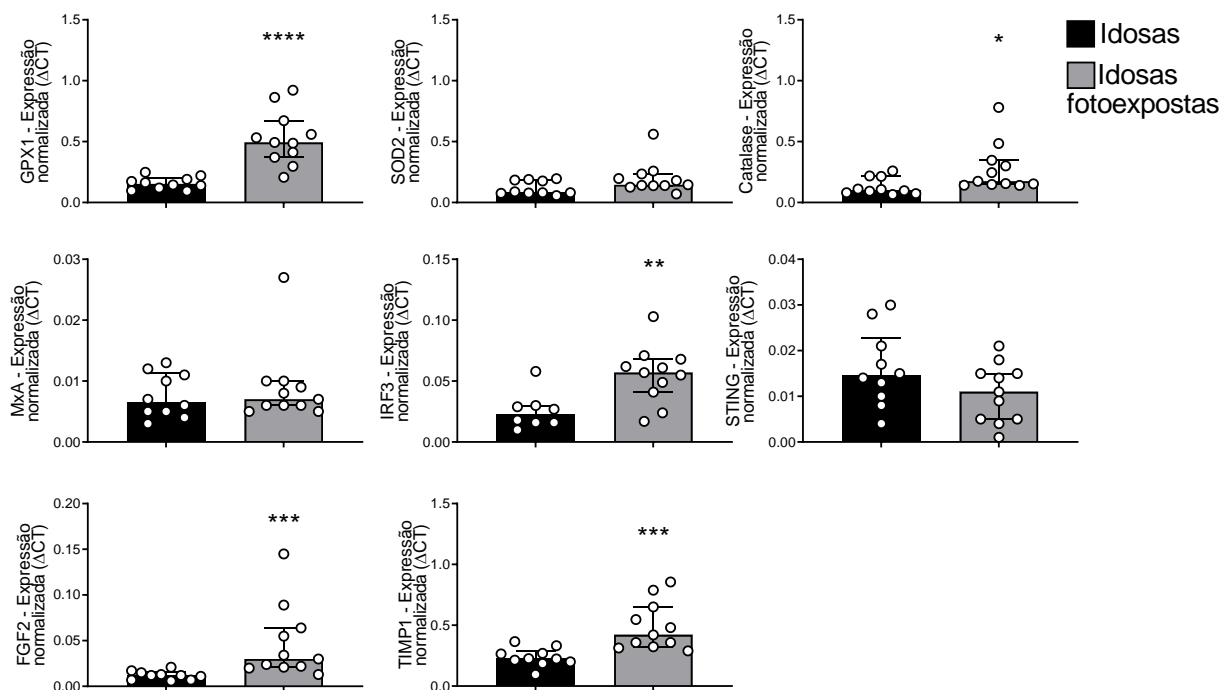


Figura 7. Perfil transcricional de envelhecimento cronológico em comparação ao fotoenvelhecimento cutâneo. O grupo "idosas" é representado por biópsias de pele de uma região não fotoexposta (região glútea) e o grupo "idosas fotoexpostas" é representado por biópsias de pele do antebraço. Comparação da expressão gênica constitutiva de genes relacionados a respostas antioxidantes, antivirais e moduladoras de voluntárias sadias

jovens e voluntárias sadias idosas por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH. N=10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste não pareado de *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ***; $p < 0,001$; ****; $p < 0,0001$.

4.4 Características dos pacientes e dos voluntários envolvidos no estudo do transcriptoma COVID-19

O grupo amostral compreendido por pacientes vítimas da COVID-19 (CV) foi composto por 8 pacientes falecidos por complicações da infecção, enquanto internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital das Clínicas, coletados pelo Serviço de Verificação de Óbitos do HCFMUSP, no período de abril a junho de 2020. Os pacientes foram homens (4 indivíduos) e mulheres (4 indivíduos), com idade entre 32 e 70 anos (média = 55,25). Considerando que nenhum dos pacientes incluídos neste grupo amostral não recebeu nenhuma vacina contra COVID-19 no momento e que todos os casos configuram gravidade e óbito, as comorbidades estão presentes em quase todos os indivíduos (tabela 7). Para o grupo controle, foram selecionadas 5 amostras de pele de doadores saudáveis (CT). Esse grupo foi composto por dois homens e três mulheres, com idade entre 29 e 70 anos (média = 62). As amostras de controle foram coletadas em 2019, quando a pandemia de COVID-19 não estava presente. Assim, não foi possível realizar teste para confirmar a ausência de infecção por SARS-CoV-2 nestes indivíduos (tabela 6).

Tabela 6 – Características do grupo amostral de controles saudáveis (CT)

Controle saudável	Idade	Gênero	Uso medicamento	Doença	Fototipo	IMC
CT - 1	69	M	-	-	I	21,56
CT - 2	73	F	Carvedilol	Hipertensão controlada	III	23,98
CT - 3	77	M	-	-	II	28,56
CT - 4	29	F	-	-	IV	19,67
CT - 5	62	F	-	-	III	27,55

Tabela 7 – Características do grupo amostral de pacientes COVID-19 (CV)

Paciente COVID-19	Idade (anos)	Gênero	Uso medicamentos	Outras doenças ou Comorbidades	Raça	IMC	Intervalo diagnóstico-óbito (dias)
CV - 1	63	M	Azitromicina, Ceftriaxone, Amicacina,	Ex-tabagista	Branca	26	25

			Teicoplanina, Oseltamivir, Metilpred				
CV - 2	71	F	Azitromicina, Ceftriaxone, Oseltamivir	DM tipo 2, asma, cardiopatia, hipertensão	Branca	28,3	7
CV - 3	53	F	Tazocin, Vancomicina, Meropenem, Oseltamivir, Hidro cortisona	DM, doença renal crônica e transplante renal	Branca	19,5	10
CV - 4	46	F	Azitromicina, Ceftriaxone, Clarithromicina, Tazocin, Oseltamivir, Hidro cortisona	Hipertensão	Branca	24,5	9
CV - 5	67	M	Azitromicina, Ceftriaxone, Oseltamivir	Cardiopatia, hipertensão, ex-tabagista	Branca	20,4	2
CV - 6	32	M	Azitromicina, Ceftriaxone, Oseltamivir, Hidro cortisona	Obesidade, hipertensão	Branca	35	6
CV - 7	34	F	Azitromicina, Ceftriaxone, Oseltamivir, Hidroxicloroquina, anticoagulante (TEP)	Obesidade, vírus influenza, leucemia	Branca	30,3	4
CV - 8	76	M	Azitromicina, Ceftriaxone, Levofloxacino, Tazocin, Vancomicina, Meropenem, Prednisona, anticoagulante (TEP)	Ex-tabagista, DPOC	Branca	26,3	NI

M = masculino; F = feminino; NI = Não informado; DM = Diabetes mellitus; DPOC = Doença pulmonar obstrutiva crônica

4.5 Análise transcriptômica de COVID-19 cutâneo

Em complementação aos dados obtidos acerca da expressão de genes antivirais e antioxidantes, estudados nas amostras cutâneas cronologicamente envelhecidas, buscamos entender o perfil inflamatório e oxidativo na pele de pacientes infectados pela COVID-19.

A Figura 8A apresenta o *heatmap* não supervisionado do *z-score* das contagens normalizadas dos 300 genes mais variáveis e mais expressos, enquanto a Figura 8B mostra o gráfico de análise de componentes principais (PCA) das mesmas amostras. O primeiro gráfico mostra que as amostras são segregadas de acordo com seus perfis de expressão. O mesmo também é observado no gráfico PCA (figura 8B), onde as amostras são discriminadas pela variância da expressão em seus respectivos grupos de origem, exceto a amostra CV04 (círculo rosa), que apresenta um perfil de expressão semelhante a um paciente não infectado (círculos verdes). A análise de expressão diferencial entre os grupos saudável e infectado está representada pelo gráfico *volcano*, na figura 8C e resultou em 1.188 genes com a expressão aumentada e 803 genes com expressão diminuída.

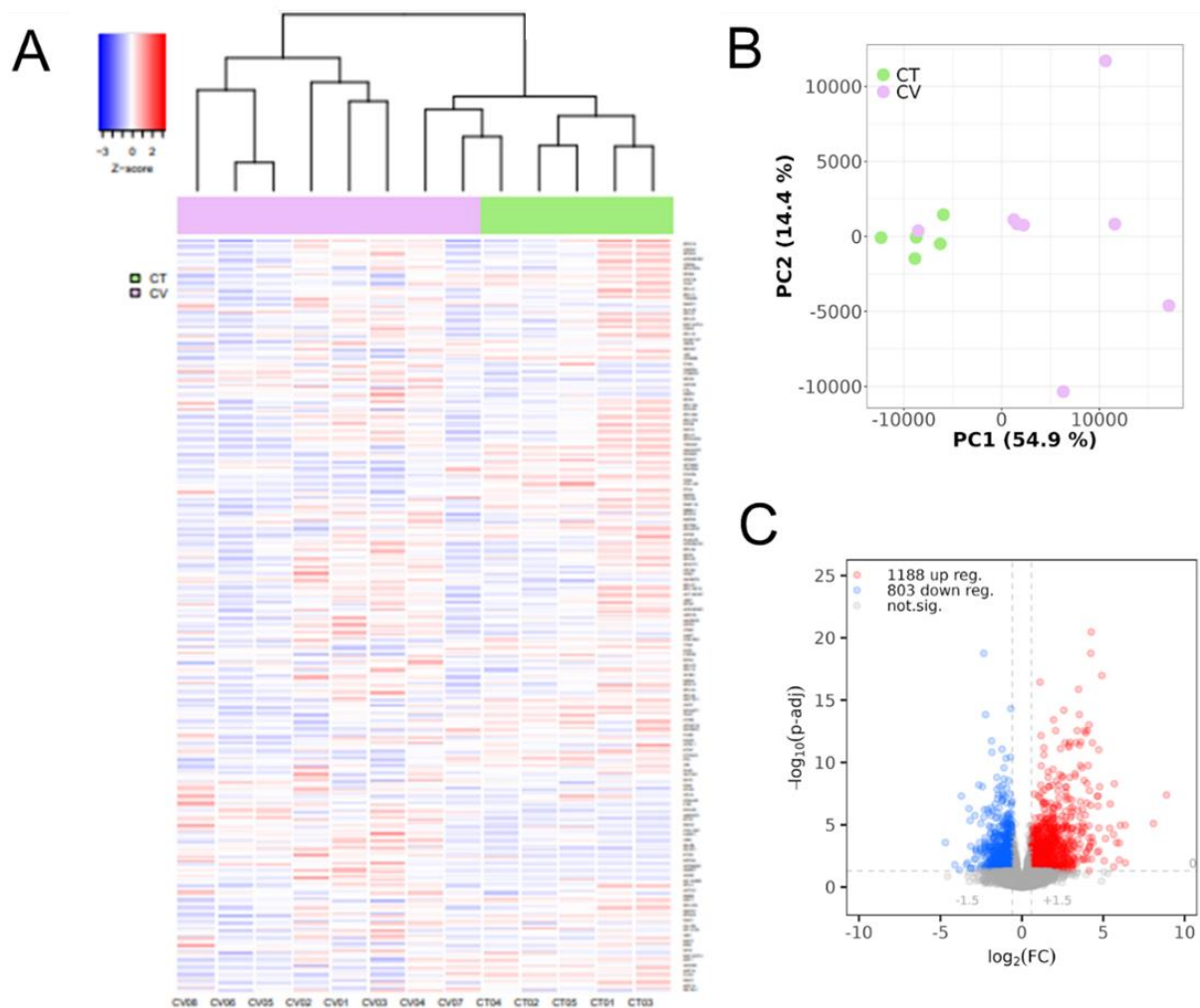


Figura 8. Análises transcriptômicas cutâneas de pacientes falecidos por COVID-19. A) *Heatmap* não-supervisionado do "z-score" das contagens normalizadas dos 300 genes mais variáveis e mais expressos. O grupo CT é colorido em verde e o grupo CV é colorido em

rosa. A expressão do gene em tons de vermelho significa expressão aumentada à média de todas amostras, enquanto cores em tons de azul significam expressão diminuída. **B)** Projeção de variância explicada nas duas maiores componentes principais obtidas na redução de dimensionalidade. **C)** Gráfico *volcano*, que relaciona o valor de p-adj como função do FC. Os genes com expressão aumentada em relação à suas médias de expressão no grupo CT estão representados por círculos na cor vermelha e os genes com expressão diminuída estão representados por círculos azuis. Os ciclos na cor cinza representam genes com alterações não significantes em relação às suas médias de expressão nos grupos controle. As linhas tracejadas verticais representam os limites absolutos dos valores FC de 1,5 e a linha tracejada horizontal representa o nível de significância de p-adj de 0,05.

A análise de enriquecimento do conjunto de genes, por sua vez, resultou em diversas vias enriquecidas com genes regulados positivamente, como resposta antiviral, cascatas inflamatórias, danos teciduais e vias relacionadas. Considerando que a COVID-19 é uma doença sistêmica e é capaz de infectar, gerar cascatas inflamatórias e causar danos teciduais em diversos órgãos, esta análise transcricional teve como foco investigar, na pele de pessoas que foram a óbito por COVID-19, vias relacionadas a esses aspectos.

A rede gênica da resposta inflamatória aguda está representada na Figura 9 e mostra a grande maioria dos genes envolvidos na via (borda magenta) com expressão aumentada em pacientes com COVID-19, com destaque para aumento na expressão nos genes: IL-6, PLSCR1, LBP, CEBPD, CXCL8 e MMP13. Curiosamente, CNTN1, MAPK1, CCN3, ELANE, HDAC4, NOTCH2 e BCL2 mostraram sua expressão regulada negativamente (Figura 9).

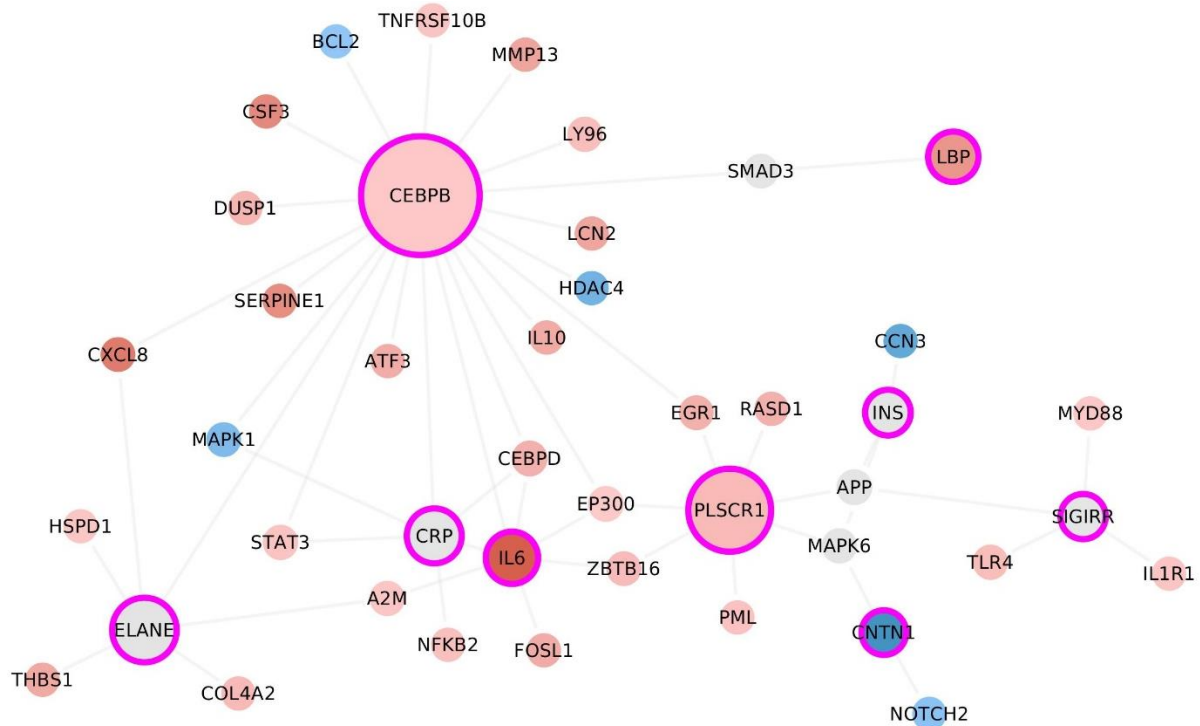


Figura 9. Rede gênica da via da resposta inflamatória aguda. Cada círculo na rede representa um gene. Os círculos coloridos em tons de vermelho representam genes regulados positivamente. Os círculos coloridos em tons de azul representam genes regulados negativamente. Círculos com borda magenta são genes que participam da via de resposta inflamatória aguda do banco de dados de vias de processos biológicos do Gene Ontology. O tamanho de cada círculo é proporcional à quantidade de genes a ele conectados.

Avaliando a rede de genes da via da desmontagem da matriz extracelular, os genes mais expressos e que chamam mais atenção são pertencentes à família das MMPs, com destaque para MMP3, MMP2, MMP7 e MMP13, conforme mostrado na Figura 10. Curiosamente, TIMP1, TIMP-2, ADAMTS4 e ADAMTS5 também mostram uma regulação positiva importante. É relevante ressaltar que a família TIMP são inibidores naturais das metaloproteinases de matriz.

Analisando os genes regulados negativamente desta mesma rede, destacamos os genes COL3A1, COL1A1, COL1A2, COL9A2, COL23A1, COL14A1, COL5A1 e COL24A1, que estão relacionados com a codificação de diferentes tipos de colágeno. Embora esses genes não participem diretamente da via de desmontagem da matriz extracelular, eles estão correlacionados a ela e podem indicar processos moleculares importantes. Curiosamente, a MMP-16 também é regulada negativamente (Figura 10).

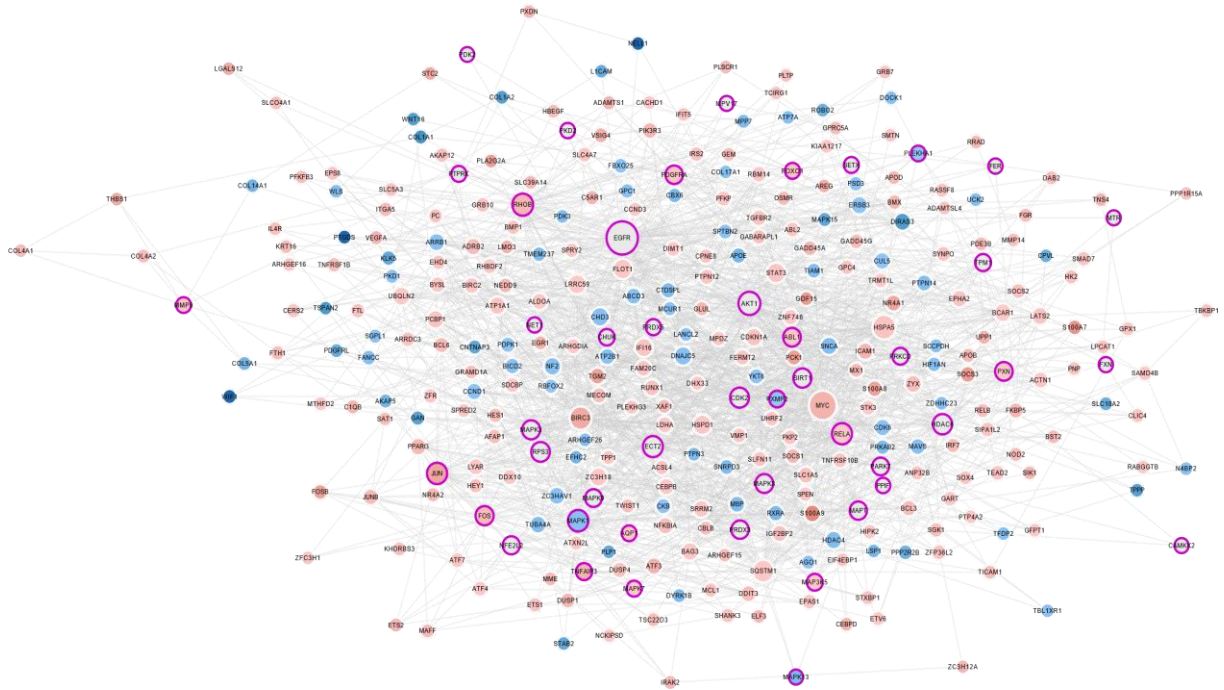


Figura 11. Rede gênica da via de resposta celular às espécies reativas de oxigênio. Cada círculo na rede representa um gene. Os círculos coloridos em tons de vermelho representam genes regulados positivamente. Os círculos coloridos em tons de azul representam genes regulados negativamente. Círculos com borda magenta são genes que participam da via de resposta celular às espécies reativas de oxigênio r do banco de dados de vias de processos biológicos do Gene Ontology. O tamanho de cada círculo é proporcional à quantidade de genes a ele conectados.

Olhando para a rede gênica de atividade MAPK representada na figura 12, os genes regulados positivamente que mais chamam atenção são MAP2K5, MAP3K5, SOCS1, SOCS2, SOCS3, TLR4, IL1B, CXCL4, SAA1 e JUN. Curiosamente, o gene FGF2 apresenta regulação positiva, porém, o gene que representa o seu receptor (FGFR2), mostrou-se regulado negativamente (figura 12).

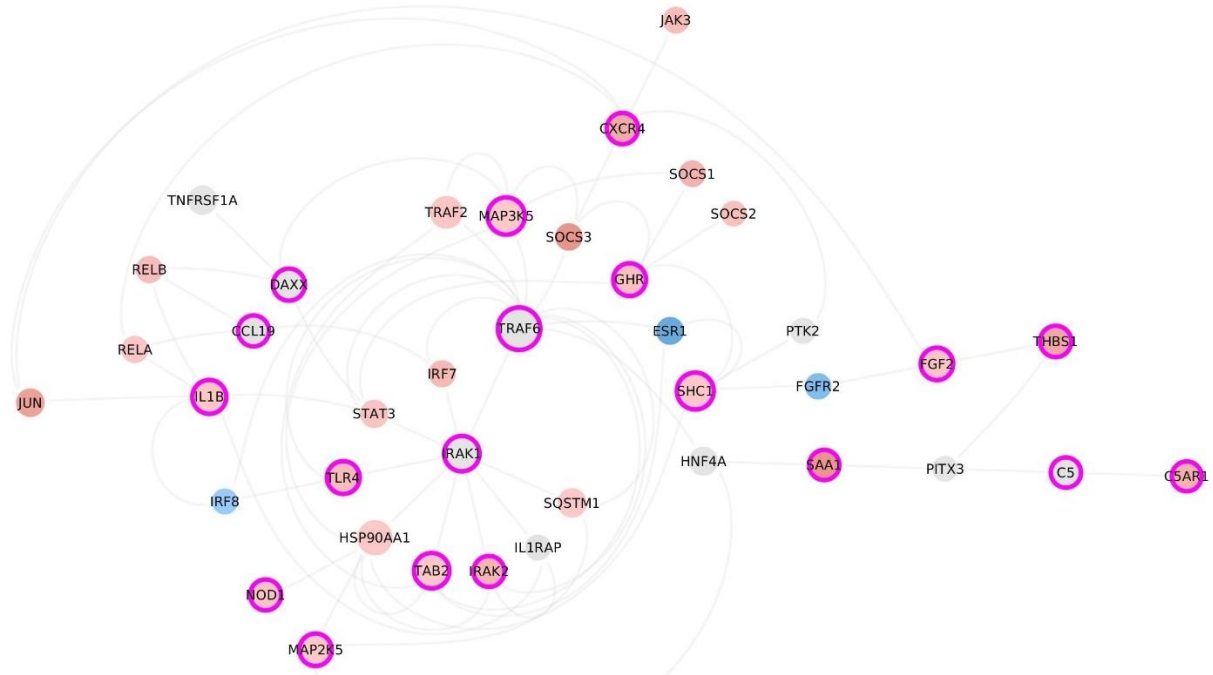


Figura 12. Rede gênica da atividade de MAPK. Cada círculo na rede representa um gene. Os círculos coloridos em tons de vermelho representam genes regulados positivamente. Os círculos coloridos em tons de azul representam genes regulados negativamente. Círculos com borda magenta são genes que participam da via de atividade de MAPK do banco de dados de vias de processos biológicos do Gene Ontology. O tamanho de cada círculo é proporcional à quantidade de genes a ele conectados.

4.6 Efeito do Resv na produção de citocinas de células mononucleares de idosas

Para compreender melhor os mecanismos envolvidos na resposta imune inata e *inflammaging*, realizamos ensaios com células mononucleares das mesmas voluntárias (jovens e idosas), com estímulos de agonistas dos TLRs 3, 4, 7 e 8, para averiguar o potencial modulador do antioxidante Resv, na produção de citocinas. Inicialmente, foi verificada a citotoxicidade de todos os compostos utilizados na cultura das células, inclusive a acetona, reagente utilizado na ressuspensão de Resv, por análise de marcação de live/dead em citometria de fluxo. A figura 13 mostra valores percentuais de sobrevivência das células em cultura com os estímulos utilizados, incubados por 24 horas. Todas as situações mostraram viabilidade de um valor muito próximo a 100% de frequência de células vivas.

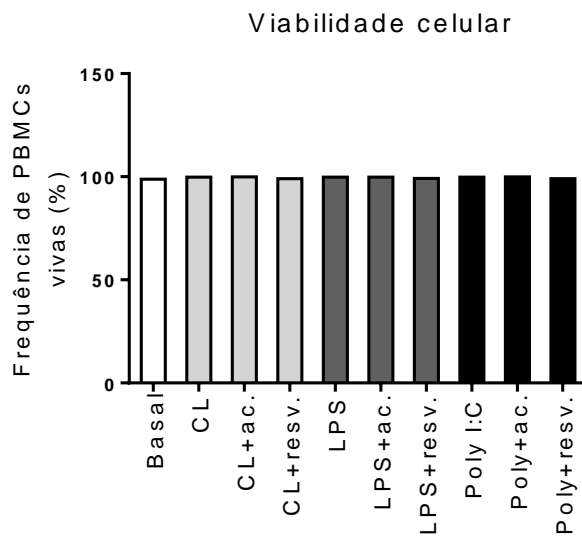


Figura 13. Viabilidade celular em PBMCs. Células mononucleares do sangue periférico de 3 indivíduos (duas idosas e uma jovem) foram incubadas por 24h com os estímulos com agonistas de TLR7/TLR8 (CL097, 2,5 µg/mL), TLR4 (LPS, 1 µg/mL), TLR3 (POLY I:C, 10 µg/mL) (Resv -100 µM) e acetona, no mesmo volume do Resv (5µL).

4.6.1 Efeito do Resv na resposta transcricional de PBMCs em estímulos com agonistas de TLRs

O Resv é um composto natural conhecido por seus inúmeros potenciais, dentre eles, a ação anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e benefícios considerando o envelhecimento (Bohara, Tabassum et al. 2022). Tais efeitos são mostrados tanto em efeitos *in vitro*, quanto *in vivo*.

Em idosos, a expressão em maior quantidade do gene de receptores do tipo *Toll* pode ser um elemento importante para o aumento de um ambiente de inflamação e senescência (Albuquerque-Souza, Crump et al. 2022, Di Zazzo, De Piano et al. 2022). Para avaliar a capacidade de um antioxidante em modular a produção de citocinas em função de estímulos da resposta inata, por agonistas de TLR, foi avaliado transcritos produzidos pelas PBMCs de voluntárias sadias jovens e idosas, estimuladas com agonistas de TLRs 3, 4, 7 e 8, em presença de Resv. Inicialmente, foi padronizado o tempo de incubação até 4 horas com os estímulos (figura 14). O estímulo com IFN neste ensaio foi realizado para amplificar mais facilmente e tornar a avaliação da expressão dos alvos mais visível.

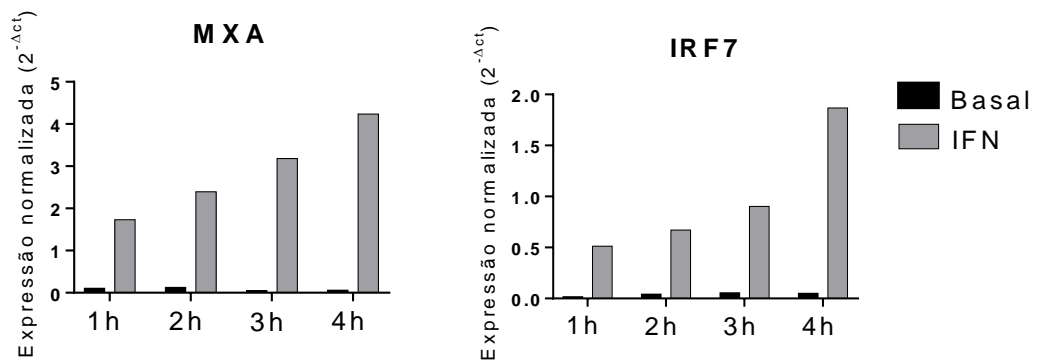


Figura 14. Cinética tempo de cultura para avaliação de transcritos. Células mononucleares do sangue periférico de 3 indivíduos (n = 3) foram incubadas por 1 hora (1h), 2 horas (2h), 3 horas (3h) e 4 horas (4h), sob estímulo de IFN.

Para uma visão geral do perfil transcricional dos grupos amostrais, foram elaborados *heatmaps* com auxílio da plataforma Morpheus (Morpheus), separados por estímulos agonistas de TLRs (figura 15, 16 e 17). A Figura 15 mostra o *heatmap* para genes antioxidantes (GPX1, SOD2, catalase e SIRT1) e genes antivirais (MxA, IRF3, IRF7 e STING) após estimulação com agonista de TLR3 (POLY I:C). Comparando as situações basais entre os grupos, jovens e idosos parecem apresentar perfil transcricional semelhante. No entanto, após a estimulação Poly(I:C) e Resv, é possível observar uma regulação positiva da expressão tanto de genes antioxidantes, quanto de genes antivirais no grupo idoso (figura 15A). No grupo jovem parece haver uma mudança transcricional após os mesmos estímulos, porém somente no conjunto dos alvos antivirais avaliados. Após a estimulação Poly(I:C) e Resv, uma regulação positiva da expressão de CAT foi observada em 31,25% dos indivíduos. Na mesma situação, foi observada uma modulação negativa de MxA e STING (figura 15B).

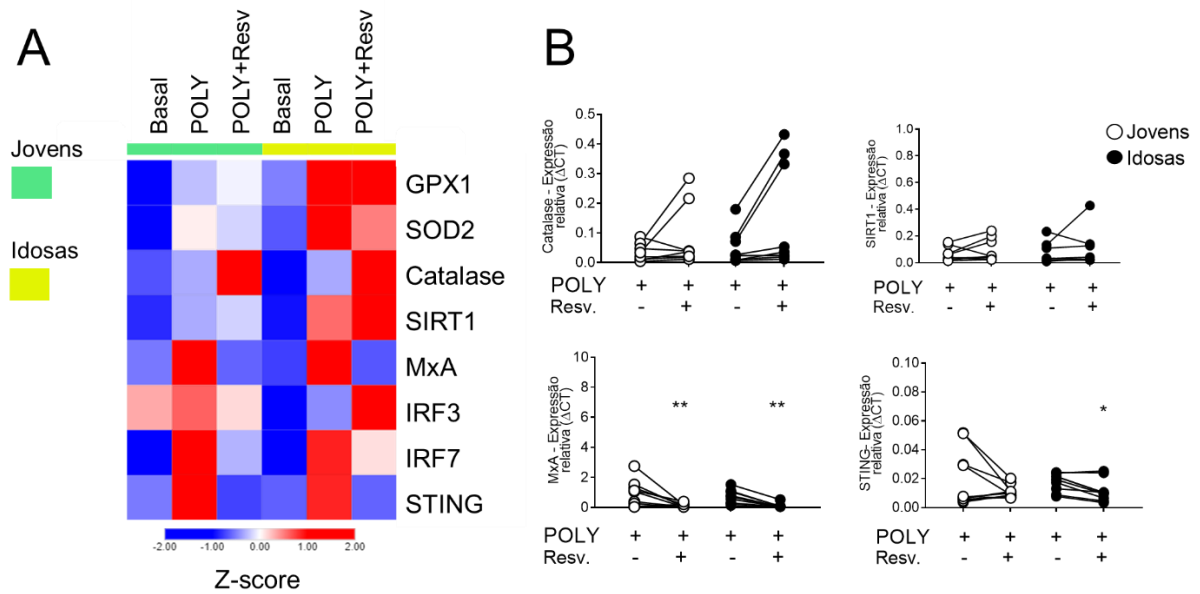


Figura 15. Mapa de calor e alvos destaques da expressão de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR3 (POLY I:C) e adição de Resv (n=20). O grupo de voluntários jovens está colorido em verde e o grupo de voluntários idosos está colorido em amarelo. A expressão do gene em tons de vermelho significa acima da média da linha, e a expressão em tons de azul significa abaixo da média. O escore Z representa a média subtraída, dividida pelo desvio padrão. Teste pareado Wilcoxon: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Estimulado vs. Não estimulado).

Durante o estímulo com agonista de TLR4 (LPS), o *heatmap*, neste caso, mostra claramente o potencial antioxidante de Resv no grupo de idosos, mostrado pela coloração vermelha após estímulo com o polifenol (figura 16A). Curiosamente, observamos uma redução na expressão dos genes antivirais após estímulo com Resv, neste mesmo grupo amostral. Resv diminuiu os níveis transcricionais de MxA induzidos por LPS em células jovens e idosos, e STING no grupo idoso (figura 16B).

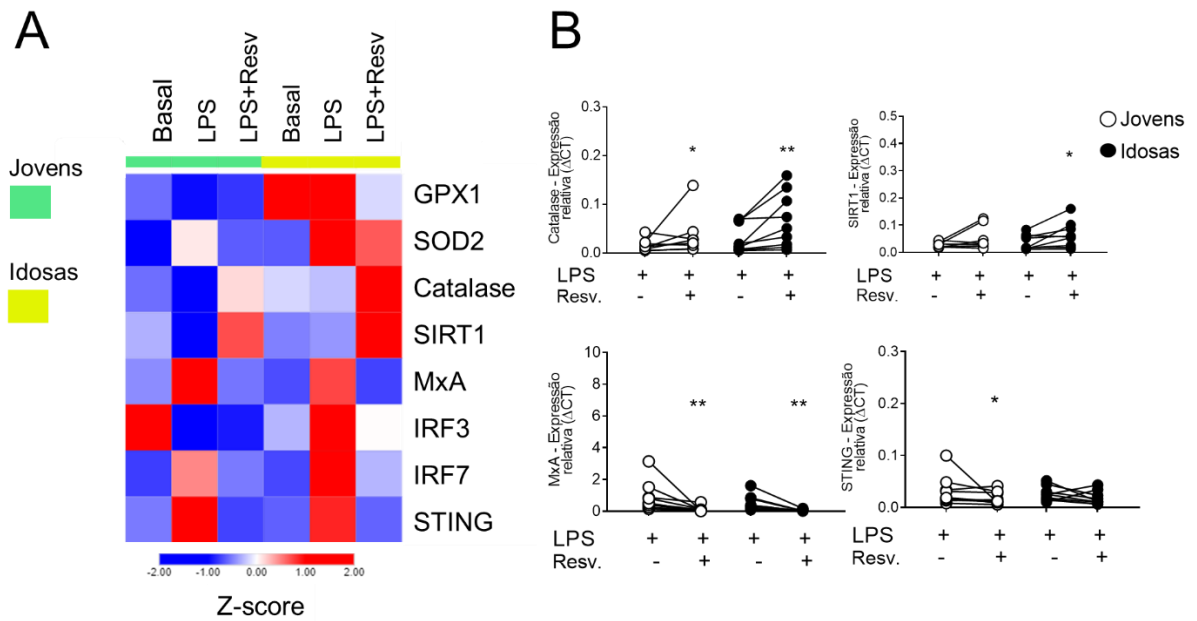


Figura 16. Mapa de calor da expressão e destaques de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR 4 (LPS) e adição de Resv (n=20). O grupo de voluntários jovens está colorido em verde e o grupo de voluntários idosos está colorido em amarelo. A expressão do gene em tons de vermelho significa acima da média da linha, e a expressão em tons de azul significa abaixo da média. O escore Z representa a média subtraída, dividida pelo desvio padrão. Teste pareado Wilcoxon: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Estimulado vs. Não estimulado/Basal).

A Figura 17A mostra que após estímulo com CL097, a adição do Resv mostrou uma expressão gênica antioxidante equilibrada e levou à diminuição de fatores antivirais como a expressão de STING e IRF7, em ambos os grupos amostrais. Catalase aparenta, nesta demonstração gráfica, aumentar sua expressão após o estímulo com Resv em ambos os grupos. Analisando a expressão gênica individualmente (figura 17B), catalase apresentou expressão aumentada em células jovens. Curiosamente, nesta mesma condição, os genes antivirais IRF7 e STING apresentaram diminuição em ambos os grupos amostrais (figura 17B).

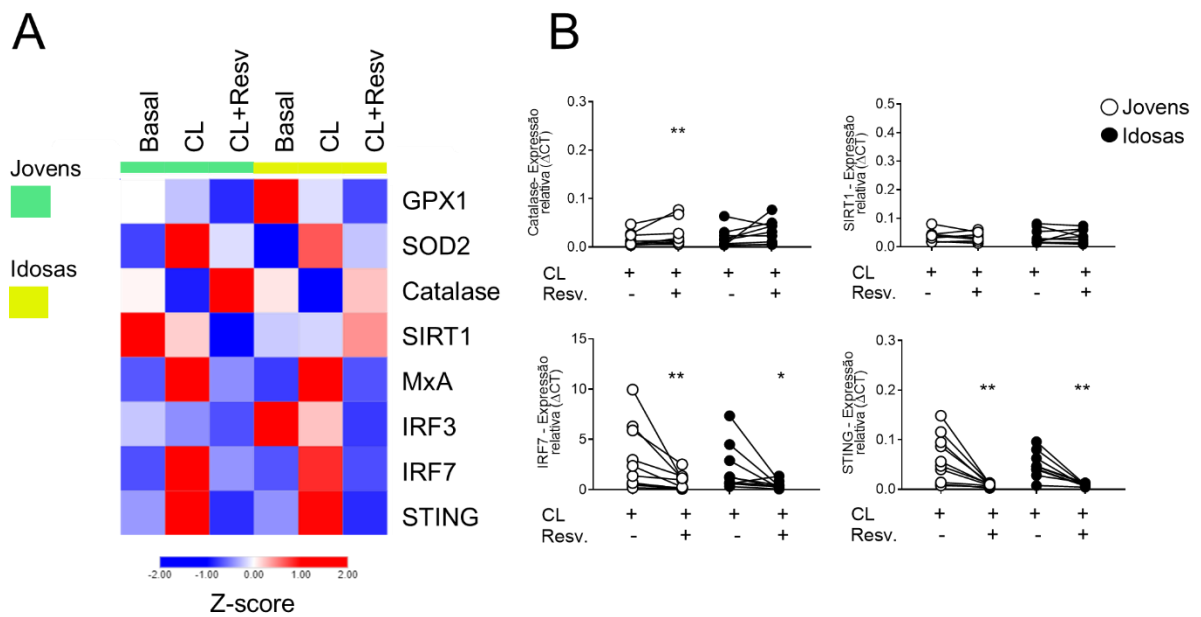


Figura 17. Mapa de calor da expressão de fatores antioxidantes e antivirais expressos por PBMC estimulados com agonista TLR 7/8 (CL097) e adição de Resv (n=20). O grupo de voluntários jovens está colorido em verde e o grupo de voluntários idosos está colorido em amarelo. A expressão do gene em tons de vermelho significa acima da média da linha, e a expressão em tons de azul significa abaixo da média. O escore Z representa a média subtraída, dividida pelo desvio padrão. Teste pareado Wilcoxon: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (Estimulado vs. Não estimulado/Basal).

Avaliando o perfil transcricional antioxidante para as mesmas situações e alvos de maneira mais abrangente (figura 18), não observamos diferença estatística para a expressão dos genes antioxidantes GPX1 e SOD2, em nenhum dos grupos amostrais. No entanto, como mostra a figura 16, o alvo antioxidante catalase mostra uma regulação positiva após adição do Resv durante os estímulos com agonistas de TLR4 (ambos grupos amostrais) e TLR7/8 (somente grupo amostral jovem), como indicava previamente os *heatmaps* para ambos estímulos, indicando aqui o potencial modulador e antioxidante do Resv.

O Resv é capaz de ativar o SIRT1 (*Silent Information Regulator 1*), um tipo de histona desacetilase, que possui inúmeros efeitos regulatórios e antioxidantes (Švajger and Jeras 2012, Qi, Fu et al. 2022). Na cultura de células com os estímulos TLRs e tratadas com este polifenol, foi avaliado o gene SIRT1, sabidamente influenciado pelo potencial modulador do Resv, uma vez que poderia estar alterado em células estimuladas. Na Figura 18, pode-se observar que na situação com

estímulo por LPS, houve modulação de SIRT1 com o tratamento com este fármaco, somente no grupo idoso.

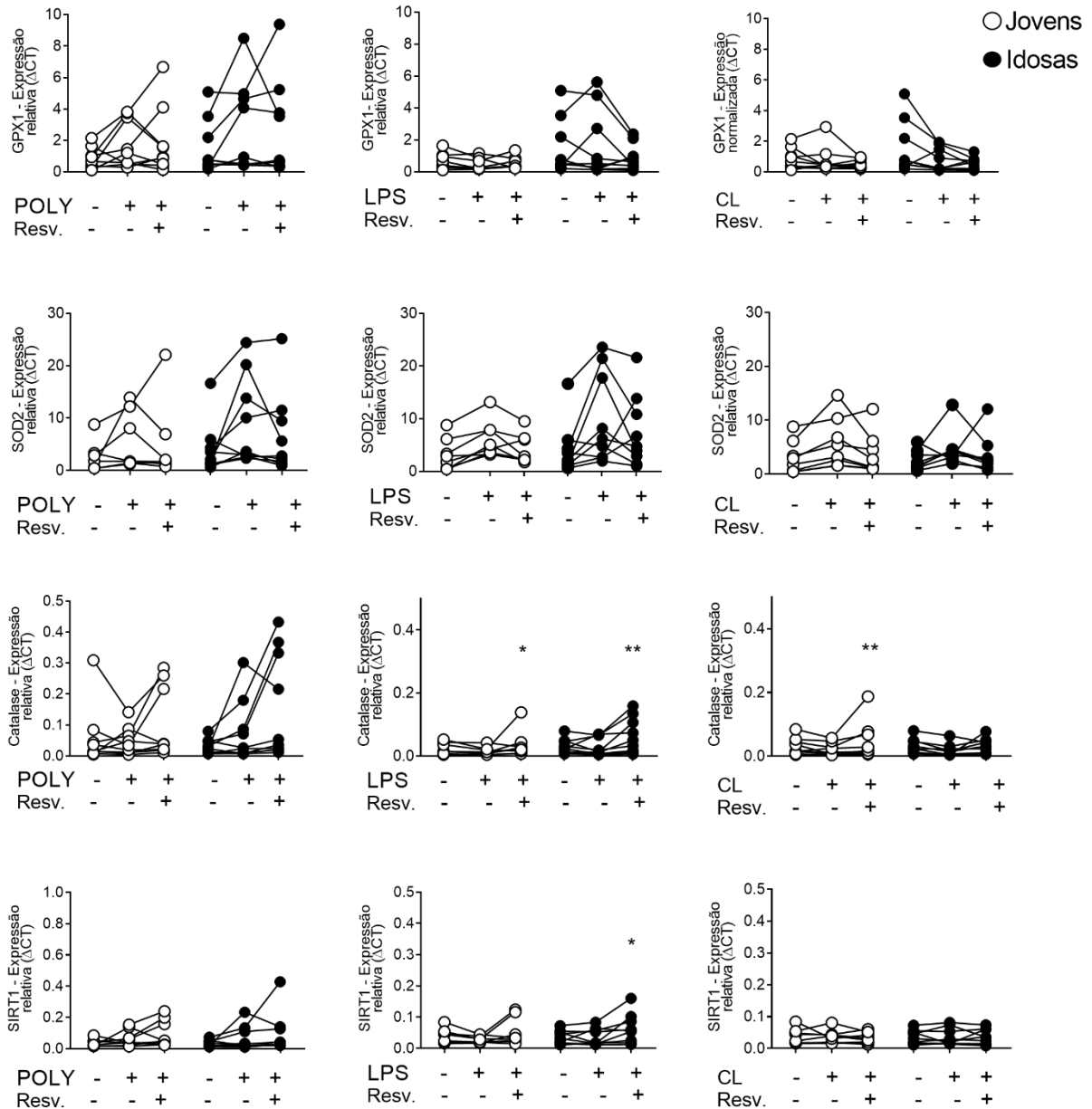


Figura 18. Efeito do Resv na expressão transcricional de fatores antioxidantes em PBMCs. Células mononucleares do sangue periférico foram incubadas por 4h com os estímulos agonista TLR7/8 (CL097 - 2,5 µg/mL), TLR4 (LPS- 1 µg/mL) e TLR3 (POLY I:C - 10 µg/mL) na presença de Resv (100 µM) e acetona no mesmo volume do Resv (5µL). Comparação da expressão gênica constitutiva de enzimas antioxidantes de voluntárias sadias jovens e voluntárias sadias idosas por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH, e em comparação à situação não estimulada. N=9-10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste pareado de *Wilcoxon*: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ (Estimulado vs. Não estimulado/Basal).

Considerando os estímulos utilizados e as vias relacionadas, também foram mensurados alvos antivirais (figura 19). Interessantemente, foi observada uma maior expressão de MxA em células estimuladas com os agonistas de TLR3, TLR4 e TLR7/8. Porém, quando tratadas com Resv, tal expressão diminuiu, chegando a níveis similares aos valores basais (figura 19).

Na expressão de STING, foi observada diminuição da expressão nos dois grupos amostrais avaliados no estímulo com CL097, que foram moduladas com o Resv. A expressão de IRF3 não se alterou em nenhuma condição. Contudo, para IRF7 foi observado aumento no grupo jovens e idosas ao estímulo TL7/8, revertendo com o Resv em ambos os grupos amostrais, porém com maior efeito em jovens (figura 19). Tais dados sugerem, como anteriormente verificado, uma possível resposta anti-inflamatória mediada por IFN pela ação do polifenol. Chama atenção que a ação do Resv é observada com o estímulo via TLRs, por provável ação na via NFkB.

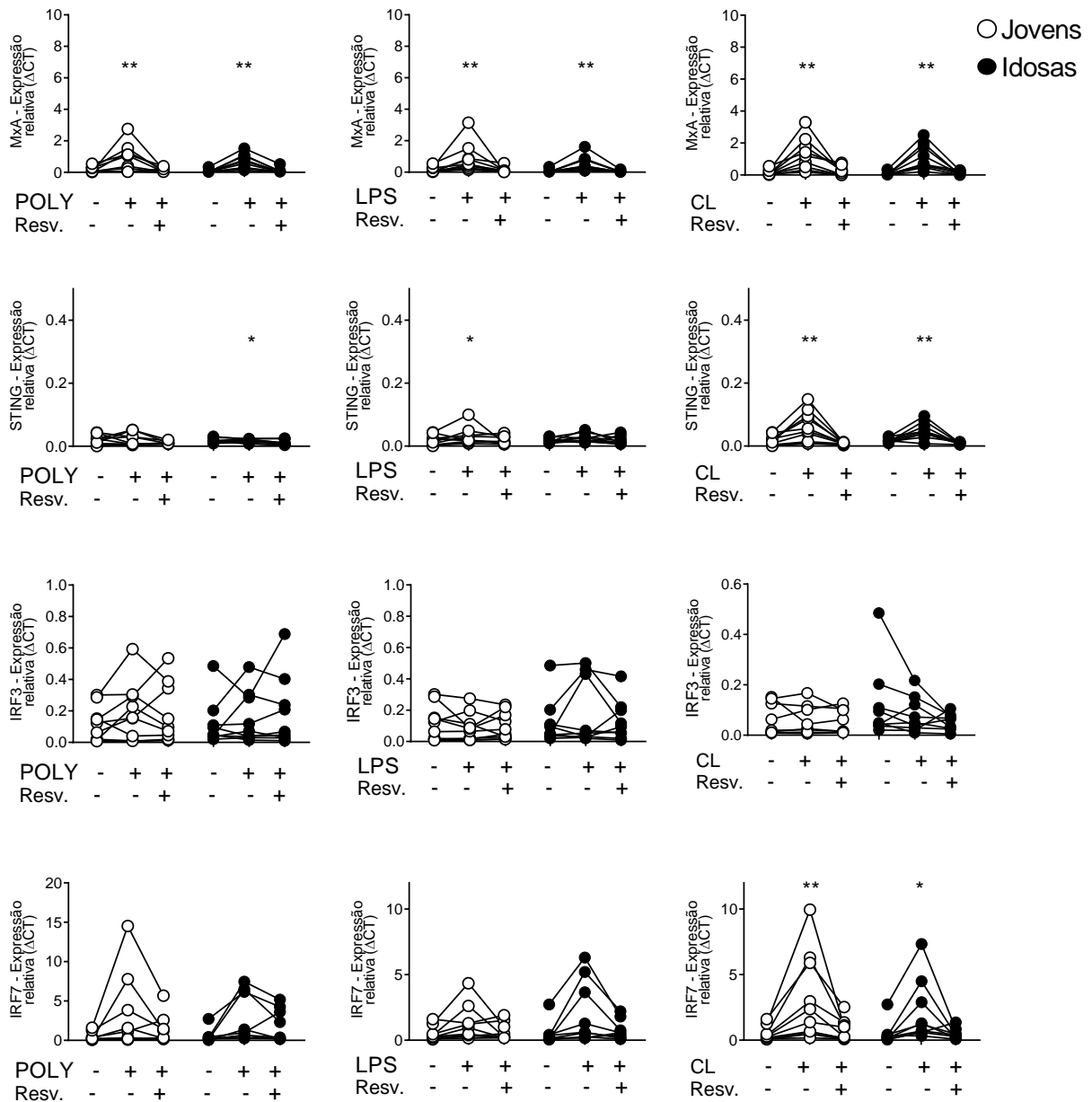


Figura 19. Efeito do Resv na expressão transcricional de fatores antivirais em PBMCs. Células mononucleares do sangue periférico foram incubadas por 4h com os estímulos agonista TLR7/8 (CL097 - 2,5 µg/mL), TLR4 (LPS- 1 µg/mL) e TLR3 (POLY I:C - 10 µg/mL) na presença de Resv (100 µM) e acetona no mesmo volume do Resv (5µL). Comparação da expressão gênica constitutiva de enzimas antioxidantes de voluntárias sadias jovens e voluntárias sadias idosas por qPCR. A expressão relativa dos alvos foi calculada em comparação à amplificação do gene constitutivo, GAPDH, e em comparação à situação não estimulada. N=9-10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste pareado de *Wilcoxon*: *p<0,05, ** p<0,001 (Estimulado vs. Não estimulado/Basal).

4.6.2 Efeito do Resv na produção de citocinas e quimiocinas de PBMCs a estímulos com agonistas de TLRs

Além dos dados transcricionais, também foi avaliado a produção de citocinas e quimiocinas induzidas após ativação dos TLRs. Na figura 20 é possível observar que, na produção de IL-1 β induzida por agonista de TLR7/8, há um efeito inibitório do Resv em ambos os grupos. Já na produção de TNF- α , o efeito inibitório mediado por Resv, no grupo idoso, foi observado para ambos os estímulos TLR4 e TLR7/8. Além disso, a produção de TNF- α está mais elevada ao agonista de TLR3 em jovens, do que para idosos (figura 20).

Para a produção de IFN- γ , o tratamento com o Resv foi capaz de modular a resposta de IFN- γ induzida pelo agonista de TLR7/8 em ambos os grupos, dados que corroboram com nossos achados transcricionais, ao observar a diminuição de genes que participam da via de IFN (figuras 19 e 20).

A citocina anti-inflamatória IL-10 também foi regulada negativamente pelo Resv, o que sugere que o mecanismo de ação anti-inflamatório deste composto pode não envolver a IL-10 (figura 20). Entretanto, a produção de IL-10 é induzida via NF κ B, descrito como um provável alvo do Resv.

Os dados representados pela produção de citocinas, mostram que o potencial modulador do Resv em idosos foi mais pronunciado na produção de citocinas, do que no perfil transcricional (figuras 18, 19 e 20).

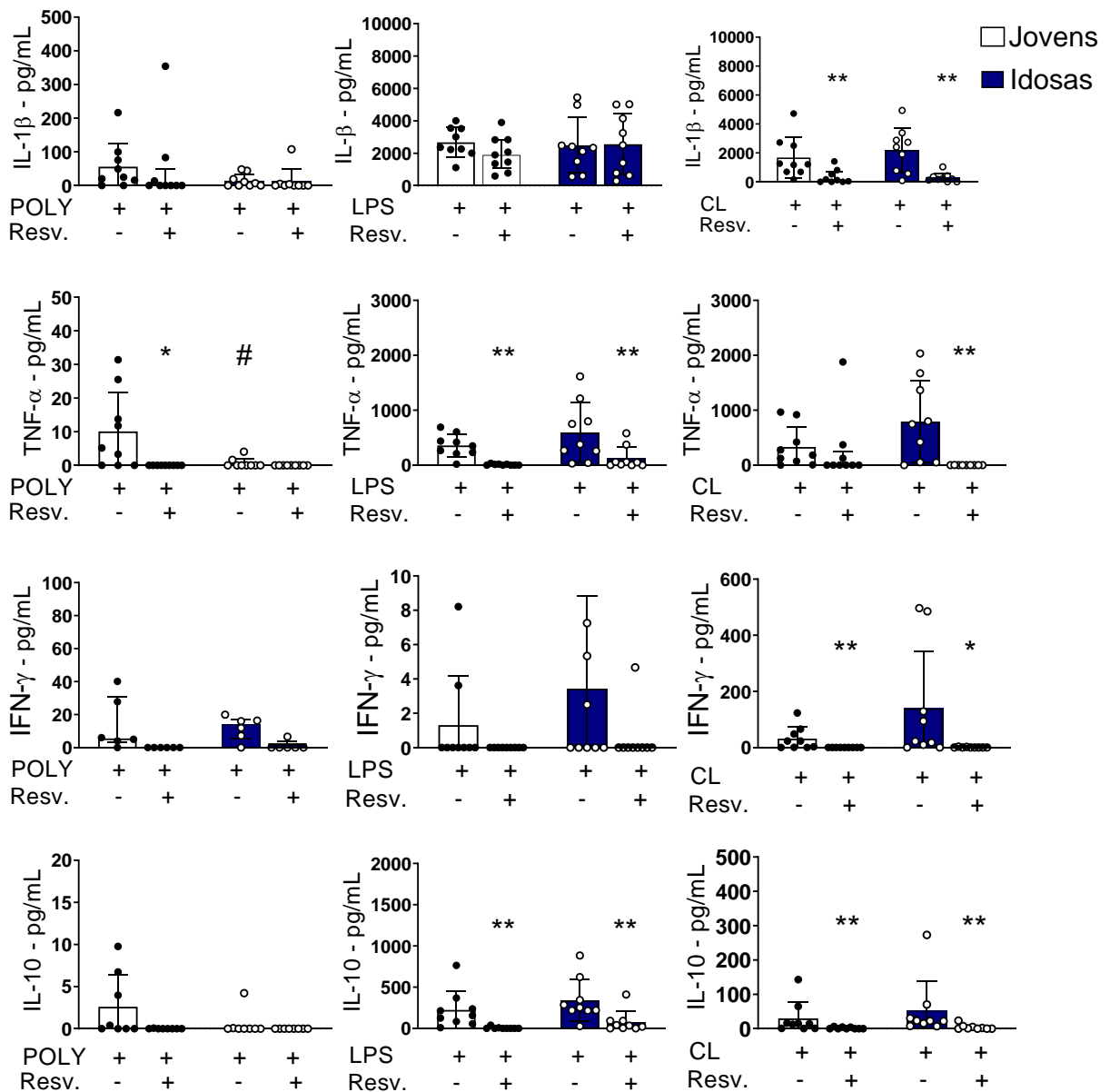


Figura 20. Produção de citocinas por PBMCs de voluntárias jovens e idosas após o estímulo com agonistas de TLR e tratamento com Resv. Células mononucleares do sangue periférico foram incubadas por 24h com os estímulos CL097 - 2,5 μ g/mL, LPS- 1 μ g/mL, POLY I:C - 10 μ g/mL, Resv -100 μ M e acetona no mesmo volume do Resv (5 μ L). A produção das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-10 foram avaliadas no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. N=9-10 indivíduos por grupo. Dados expressos após subtração do valor basal, em mediana e intervalo interquartil. Teste não pareado de *Mann Whitney*: # p <0,05 (jovens vs. idosas). Teste pareado de Wilcoxon: * p <0,05; ** p <0,01 (Estimulado vs. Não estimulado).

A ativação por TLR pode, além de levar a produção de citocinas inflamatórias, realizar a produção de β -quimiocinas, como CCL2, CCL4 e CCL5 (Mitchell and Olive 2010). Nesse contexto, avaliamos, sem a subtração dos valores basais, a expressão das quimiocinas CCL2 e CCL5, para melhor avaliar o efeito do

Resv. Na Figura 21, é mostrado que o Resv é capaz de diminuir, já nos níveis basais, a produção de CCL2. Com o estímulo, seja para TLR3, TLR4, ou TLR7/8, houve diminuição no tratamento com o polifenol, em ambos os grupos jovens e idosas.

Curiosamente, as células ativadas com LPS do grupo de idosas mostrou uma maior quantidade de CCL2, quando comparada com as células do grupo jovens, corroborando com a hipótese de inflammaging (figura 21). Já o Resv foi capaz de diminuir os níveis basais de CCL2, como também com o estímulo, seja para TLR3, TLR4, ou TLR7/8, em ambos os grupos jovens e idosas.

Na avaliação da produção da quimiocina CCL5, também foi observado modulação negativa de Resv com o agonista de TLR3 no grupo amostral das jovens, de TLR4 em sobrenadantes de ambos os grupos amostrais e TLR7/8 em sobrenadantes somente das idosas (figura 21). É possível observar pela primeira vez que o Resv foi capaz de modular negativamente as citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ , induzidas por LPS ou CL097, incluindo também a anti-inflamatória IL-10. Já com as quimiocinas, o Resv foi capaz de regular negativamente os níveis basais elevados de CCL2 em ambos os grupos, como também os induzidos por agonistas de TLRs.

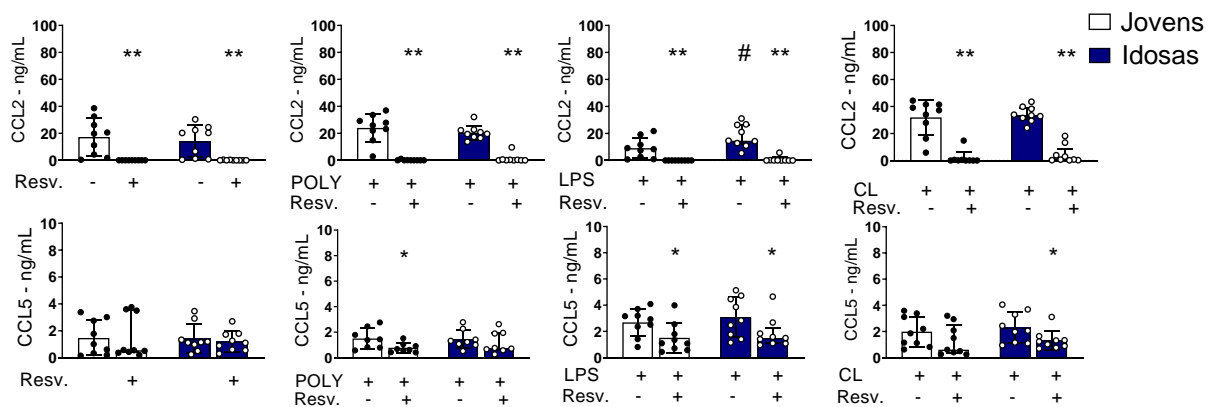


Figura 21. Produção de quimiocinas por PBMCs de voluntárias jovens saudáveis e voluntárias idosas saudáveis após o estímulo com agonistas de TLR e tratamento com Resv. Células mononucleares do sangue periférico foram incubadas por 24h com os estímulos CL097 - 2,5 μ g/mL, LPS- 1 μ g/mL, POLY I:C - 10 μ g/mL, Resv -100 μ M e acetona no mesmo volume do Resv (5 μ L). A produção das quimiocinas CCL2 e CCL5 foi avaliada no sobrenadante das culturas por citometria de fluxo. N=9-10 indivíduos por grupo. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Teste não pareado de *Mann Whitney*. # p <0,05 (jovens vs. idosas). Teste pareado de *Wilcoxon*: * p <0,05; ** p <0,01 (Estimulado vs. Não estimulado/Basal).

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo buscou entender imunossenescência e *inflammaging*, avaliando o estresse oxidativo, fatores antivirais e pró-inflamatórios na pele envelhecida cronologicamente e extrinsecamente (exposta a radiação UV), e vias relacionadas aos mesmos tópicos em pele de pacientes com COVID-19. Avaliamos também o potencial do Resv em modular a resposta inflamatória das células mononucleares do sangue periférico de voluntárias sadias jovens (21-30 anos) e idosas (60-77 anos) na produção de citocinas induzidas por agonistas de receptores TLR3, TLR4 e TLR7/TLR8.

O perfil transcricional de amostras cutâneas envelhecidas cronologicamente foi analisado para compreender aspectos intrínsecos deste tipo de envelhecimento na pele. Alvos relacionados à resposta antioxidante não se mostraram significativamente alterados. No entanto, alvos como o fator de crescimento de fibroblastos beta (FGF2) e o inibidor de metaloproteinases tecidual (TIMP1) mostraram-se aumentados em idosas, sugerindo uma maior proteção e reparo natural ao envelhecimento por vias relacionadas ao colágeno. O FGF2 está altamente associado à produção de colágeno, proliferação celular e ao potencial de cicatrização na pele (Panichakul, Ponnikorn et al. 2022). Já o TIMP1, é capaz de inibir a atividade de diferentes MMPs, e de modular o aumento de citocinas como TNF- α (Leonardi, Cortivo et al. 2003). Sendo assim, é possível que o aumento transcricional no grupo idosas de TIMP1, seja um dos mecanismos cronológicos no controle da degradação de colágeno via MMP, que pode estar associado ao *inflammaging*, fenômeno associado ao envelhecimento.

Curiosamente, o fator antiviral IRF3 mostrou redução da expressão transcricional no grupo idoso. Porém, a expressão proteica por imunohistoquímica, foi mais elevada no grupo das mulheres idosas, na camada epidérmica. Recentemente, foi observado a importância da sinalização antiviral para o HSV, envolvendo a via de HSV e TRIM26, onde o IRF3 fosforilado resulta na transcrição de IFN tipo I e opera uma resposta antiviral importante (Dhawan, Zahoor et al. 2021). Nossas amostras para o estudo do envelhecimento cronológico são provenientes de uma região de próxima ao tronco, e, portanto, região de inervação ao contato com infecção causada pelo vírus varicela zoster (Herpes zoster), onde há maior

reativação em idosas. É possível que o aumento de IRF3 pode estar associado à proteção desta região.

A comparação do envelhecimento cronológico e do fotoenvelhecimento foi realizada com amostras de região não fotoexposta, com uma região que sofreu fotoexposição, ambas de idosas. Chama a atenção o aumento de alvos relacionados às respostas antioxidantes (GPX1 e catalase), em amostras que sofreram fotoexposição. A exposição ao raio UVB leva ao aumento da resposta inflamatória e danos no DNA na pele. Conseqüentemente, como uma forma de reparo importante, ocorre o aumento de enzimas antioxidantes (Truong, Rarison et al. 2022). Esse pode ser um mecanismo para entendimento do aumento destes alvos antioxidantes somente em pele de idosas que sofreram fotoexposição ao longo da vida.

Os genes TIMP1 e FGF2 também mostraram aumento transcricional no grupo fotoexposto, sugerindo também uma forma de reparo da matriz extracelular, possivelmente lesionada devido a exposição solar. Tem sido descrito que o TIMP1 atua no reparo de fibroblastos dérmicos humanos expostos a radiação UV (Choi, Han et al. 2021, Yuksel Egrilmez, Kocturk et al. 2022), bem como na linhagem de queratinócitos HaCat sob as mesmas condições (Cui, Ma et al. 2021). Em um modelo murino, foi observado que nanopartículas de FGF2 são mais eficazes na prevenção do fotoenvelhecimento da pele, atuando na diminuição da elasticidade e apoptose de fibroblastos e queratinócitos (Takabayashi, Kuwabara et al. 2018). Nossos achados, no entanto, salientam a atuação de TIMP1, associado ao FGF2 característicos do envelhecimento *in situ*, seja ele cronológico ou fotoenvelhecimento.

Um dos fatores cruciais na regulação da resposta de IFN tipo I, é o IRF3, que mostrou estar elevado na pele do grupo fotoexposto. Danos ao DNA na pele, causados por exposição solar, podem ser reconhecidos como um DAMP e envolver vias de sinalização com receptores de DNA citosólicos cGAS-STING (Li, Liu et al. 2021). Possivelmente, neste contexto, a maior exposição a raios UV pode aumentar a translocação nuclear de IRF-3. Tal achado necessita, no entanto, ser melhor elucidado quanto à expressão inativa e ativa de IRF3, e sua translocação nuclear.

Considerando as redes gênicas obtidas a partir do transcriptoma de amostras de pele de pacientes com COVID-19 em comparação a pele de indivíduos saudáveis, observa-se, na rede relacionada a resposta inflamatória aguda expressão aumentada (tons vermelhos) de genes como a IL-6, citocina amplamente conhecida por seu papel na resposta imune e na inflamação, especialmente na COVID-19 (Zizzo, Tamburello et al. 2022). PLSCR1, também com regulação positiva nesta via, está relacionado à codificação de uma proteína conhecida como fosfolípido scramblase 1 e está intimamente ligada à sinalização de respostas antivirais induzidas por IFN (Dong, Zhou et al. 2004), enquanto o gene LBP tem correlação com a resposta imunológica de fase aguda a infecções bacterianas gram-negativas (Eckert, Kim et al. 2013). No mesmo sentido, CEBPD é descrito como regulador de genes relacionados a respostas imunes e inflamatórias (Wang, Ko et al. 2006), com destaque para ativação e diferenciação de macrófagos, célula com importante função fagocítica em um contexto de infecção viral, como a COVID-19. O aumento de tais genes provavelmente está relacionado a resposta inflamatória exacerbada na pele de pacientes graves.

CXCL8, gene também regulado positivamente também na rede gênica de inflamação aguda, é um membro da família de quimiocinas (CXC) e desempenha um importante papel na resposta inflamatória como um todo. Entre suas inúmeras funções, se codificado em proteína, levará a secreção da IL-8, interleucina secretada por diversos tipos celulares e amplamente relacionada a quimiotaxia de neutrófilos ao tecido ou local onde está instaurada uma infecção (Mantovani, Cassatella et al. 2011). Corroborando com este dado, em um estudo avaliando a degranulação de neutrófilos em pacientes com COVID-19 hospitalizados e não hospitalizados, foi visto um aumento considerável desta quimiocina produzida por estas mesmas células (Hafkamp, Taanman-Kueter et al. 2023).

MMP13, tendo como parálogo o MMP10, também mostrou expressão aumentada. As proteínas da família das MMPs estão envolvidas na quebra da matriz extracelular e na remodelação tecidual, como já descrito nesse estudo, no contexto do envelhecimento cutâneo. Especificamente, a MMP13, está relacionada a clivagem do colágeno tipo II (Knäuper, Cowell et al. 1997), podendo indicar um dano na pele causado pela infecção por SARS-CoV-2.

Ainda na via relacionada a resposta inflamatória aguda, foi visto que o gene BCL2 está regulado negativamente e tem correlação com a diminuição da apoptose de linfócitos, além de demonstrar ação anti-inflamatória pela sua relação com a via TGF- β , atenuando a inflamação ao diminuir a ativação do inflamassoma NLRP1 e, conseqüentemente, a liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Bruey, Bruey-Sedano et al. 2007). Tal achado pode mostrar que pacientes com a forma grave da COVID-19 podem demonstrar uma menor capacidade de regulação da inflamação.

Os genes membros da família MAPK também mostraram regulação negativa na via de inflamação aguda. As MAPKs são também chamadas de quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs). MAPK1 e outros genes MAPKs são conhecidos pelo seu envolvimento em processos celulares como proliferação, diferenciação e regulação transcricional (Braicu, Buse et al. 2019). No mesmo sentido, o gene CCN3 também desempenha papéis importantes na proliferação e diferenciação celular, mas também é conhecido por regular negativamente respostas inflamatórias, principalmente através da diminuição da adesão de monócitos e inibição da via NF κ B (Lin, Natesan et al. 2010). Curiosamente, CCN3 também é descrito pela sua capacidade de regular a expressão de genes relacionados a dano tecidual como MMP13 e genes inflamatórios, como CCL2 (Le Dreau, Kular et al. 2010, Tzeng, Chen et al. 2011), sugerindo menor performance celular, no sentido de reparo tecidual e, mais uma vez, uma menor capacidade de regulação da inflamação em pacientes COVID-19.

ELANE, também com expressão reduzida, é um gene que, quando codificado, é uma elastase produzida por neutrófilos, envolvido principalmente em respostas inflamatórias através da proteólise do colágeno IV e de fibras de elastina (Rydzynska, Pawlik et al. 2021). Por outro lado, HDAC4, que também mostrou estar regulada negativamente, é conhecida por estar intimamente relacionada às sirtuínas, conjunto de enzimas já discutidas no presente trabalho, sugerindo aqui uma diminuição da ação antioxidante e da longevidade celular em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

Na rede gênica de desmontagem da MEC foi visto o aumento da expressão de diversos subtipos de MMPs, relacionadas a dano tecidual e destruição de fibras de colágeno e, em concordância, diminuição de genes que codificam cadeias pró-colágenas, sugerindo, aqui, eventos danosos na derme dos pacientes.

Avaliando a rede de genes da resposta celular às espécies reativas de oxigênio, JUN mostrou estar regulado positivamente e está relacionado a heterodimerização de proteínas da família FOS, o que leva a formação de um complexo de transcrição chamado AP-1, estando altamente relacionado à morte celular por estresse oxidativo e outros processos celulares. Semelhantemente, JUNB, também regulado positivamente, relaciona-se a via de sinalização de IL-1, uma citocina com importante papel mediador da resposta imune e bastante presente durante o estado de hiper inflamação e *cytokine storm* descritos na COVID-19 (Karin, Liu et al. 1997). PLA2G2A pode estar relacionado à resposta inflamatória mediada por fosfolípidios extracelulares, enquanto o gene NR4A1 é um receptor nuclear, estando relacionado a atenuação das vias NFκB e AMPK (Ishizaki, Suzuki et al. 1999, Harant and Lindley 2004).

Em desacordo com a regulação negativa de MAPK1, visto também na rede gênica relacionada a respostas celulares a ROS, o gene DUSP1, regulado positivamente, é descrito por sua capacidade de desfosforilar o eixo MAPK1/ERK2 e levar a sua codificação de MAPK1 de fato, isto quando codificado em proteína (Lang, Hammer et al. 2006). Essa resposta é relacionada a estresse e regulação negativa da proliferação celular.

Também com regulação negativa na via relacionada ao estresse oxidativo, os genes PTPN3 e GPC1 se relacionam a processos de divisão e regulação do crescimento celular. GPC1, no entanto, possui ainda correlação e ligação ao fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2) (Sparn, Dimou et al. 2022), fator visto neste trabalho com maior expressão na pele de idosas. No contexto da infecção por SARS-CoV-2, pode estar indicando uma diminuição do reparo tecidual na derme.

O gene APOE, entre outras funções, está envolvido nas respostas imunes inatas e adaptativas, sugerindo, por estar regulado negativamente na rede gênica relacionada a respostas celulares a ROS, uma inabilidade imunológica ou diminuição da resposta de células mieloides em pacientes que foram a óbito por COVID-19.

Na rede gênica de atividade MAPK, foi visto enriquecimento da família de genes SOCS, que é conhecida como um supressor da sinalização de citocinas que utilizem a via JAK/STAT como IL-1, IL-6 e IFN-γ, através do mecanismo de *feedback*

negativo (Morris, Kershaw et al. 2018). Corroborando com este achado, foi visto a regulação positiva também de IL1B. O gene SAA1 codifica um membro da família sérica amilóide A de apolipoproteínas, altamente expressa em casos de inflamação aguda e lesão tecidual, como um agente protetor (Cheng, Liang et al. 2018).

Em adição a genes regulados positivamente, foi também visto o enriquecimento do gene TLR4, que já foi descrito como um facilitador para entrada do SARS-CoV-2 na célula, principalmente através de sua ligação com a glicoproteína spike do vírus. Não obstante, este receptor está associado a hiperinflamação causada pela COVID-19, em casos mais graves da doença (Aboudounya and Heads 2021). No entanto, em um contexto cutâneo, tal achado ainda não foi descrito e precisa ser melhor elucidado.

Em paralelo às análises na pele, avaliamos as respostas celulares de PBMCs das mesmas voluntárias sadias jovens e idosas quanto a capacidade de produção de citocinas e o potencial imunomodulador do Resv. Sem alterações significativas na viabilidade celular, mostradas na marcação celular com live/dead, o Resv mostrou-se um potencial anti-inflamatório e antioxidante aos diferentes estímulos com agonistas de TLRs. Chama atenção que estímulos que induzem resposta inflamatória como o LPS, ou CL097, foram capazes de reduzir a expressão do fator antioxidante catalase, e que o Resv foi capaz de aumentar a expressão deste fator, após o estímulo com agonistas de TLR4 e TLR7/8. De fato, tem sido descrito em modelo murino, que o Resv é capaz de reverter danos causados por LPS, aumentando a atividade da catalase e as atividades da SOD no plasma de animais suplementados com este composto (He, Li et al. 2022).

Nosso trabalho mostra que o estímulo com LPS e Resv induz o aumento da expressão de SIRT1, no grupo idosas. A SIRT1 é induzida pelo Resv e pertence à família de histonas desacetilases NAD-dependentes, além de estar envolvida na regulação do gene p53. É conhecido também por seu efeito protetor e por aumentar a longevidade celular (Wang, Luo et al. 2014, Hodge, Tran et al. 2020). No mesmo sentido, já foi descrito que este polifenol inibe a liberação de ROS em PBMCs (Yang, Dong et al. 2018). Sendo assim, provavelmente, a via de sinalização anti-inflamatória no nosso estudo acontece por modulação desta via, já que envolve o aumento da expressão de SIRT-1.

Nos alvos antivirais avaliados, houve aumento da expressão de MxA em todos os estímulos utilizados (POLY:IC, LPS e CL097) quando comparado com os níveis basais. O Resv, por sua vez, diminui a expressão de fatores antivirais. O mesmo foi visto para STING em todos os estímulos de TLR e IRF7 durante estímulo com TLR7/8, sugerindo que o Resv é capaz de exercer uma função anti-inflamatória através da modulação de fatores antivirais, além de sua ação antioxidante. O efeito antiviral do Resv já é bem descrito, com provável modulação das vias envolvendo a proteína p53, o fator NFκB e SIRT1 (Campagna and Rivas 2010), corroborando em partes com nossos dados, uma vez que não mostram uma diferença transcricional de IRF3, porém, mostram uma diminuição da expressão de STING mediada pelo Resv. De fato, foi descrito que o Resv exerce efeitos anti-inflamatórios através da supressão da via de sinalização STING/TBK1/IRF3 (Kang, Shi et al. 2022). Assim, os nossos dados mostram que o Resv, também pode gerar diminuição transcricional de MxA e IRF7. O Resv possui um efeito inibitório na secreção de IFN-γ (Ahmad, Ansari et al. 2018), e que a maioria dos genes antivirais pertence ao ISG. Além disso, o efeito inibitório Resv dos genes inflamatórios induzidos por IFN-γ talvez esteja relacionado à diminuição da ativação de STAT-1 (Chung, Kim et al. 2011).

Na avaliação do efeito do Resv, foi observado inibição das citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, TNF-α e das citocinas IFN-γ e IL-10, especialmente no grupo de idosos. Uma vez que a modulação da produção de citocinas por Resv foi eficaz para este grupo, salientamos sua ação anti-inflamatória. As vias de sinalização de TLR4 e TLR7/TLR8, compreendem não só a via NFκB, como também IRF7 e MAPK, o que sugere que o Resv pode modular estas vias de sinalização. Já foi descrito que efeito *in vitro* do Resv é capaz de diminuir mRNA de TLR4, o que gera a hipótese de que tal composto pode inibir a ativação da via de sinalização TLR4, e, conseqüentemente inibiria as vias NF-κB, MAPK e c-Jun (Tong, Chen et al. 2020).

A citocina anti-inflamatória IL-10 induzida por estímulos como LPS e CL097, foi diminuída com o Resv, em ambos os grupos analisados. Previamente o nosso grupo demonstrou que, o estímulo com CL097 induz a produção de citocinas inflamatórias, como também induz a secreção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos infectados por HIV-1 (Cardoso, Pereira et al. 2013). A inibição de IL-10

por Resv, é observado ser elevada por alguns (Tong, Chen et al. 2020) e inibida por outros (Zhang, Huang et al. 2020), dependendo do modelo estudado.

Na avaliação da produção de IFN- γ , como esperado, foi observado estar elevado nos estímulos com POLY I:C e CL097, uma vez que utilizam vias relacionadas a respostas antivirais, mas que foram diminuídas com o Resv. Em outros contextos, há mais uma vez a descrição de aumento de IFN- γ (Noh, Cho et al. 2015, Zhang, Huang et al. 2020). É curioso notar que nossos dados mostraram aumento transcricionais de fatores antivirais, como MxA e IRF3/7 que são induzidos por IFN- γ , mas também por IFN tipo I, um fator não mensurado por nós. Por outro lado, este composto apresenta efeito direto sobre vírus RNA ou DNA, enfatizando o Resv como um medicamento antiviral promissor. O efeito do Resv foi demonstrado na atividade antiviral para HSV (Faith, Sweet et al. 2006), vírus sincicial respiratório (Liu, Zang et al. 2014), vírus zika (Mohd, Zainal et al. 2019), SARS-CoV-2 (Yang, Wei et al. 2021) e vários outros vírus. Em nossos resultados já publicados, avaliamos indivíduos idosos saudáveis, enquanto observamos que Resv *in vitro* é capaz de diminuir o *status* ativado por neutrófilos e as armadilhas extracelulares de neutrófilos em pacientes com COVID-19 grave (de Souza Andrade et al. 2022).

Quanto as quimiocinas CCL2 e CCL5, foi visto uma diminuição considerável após estímulo com Resv, seja dos níveis basais, como também após estímulos com agonistas de TLRs. Uma das fontes destas quimiocinas são os monócitos presentes nas PBMCs, que produzem estas mesmo em situação não estimulada nas células. Foi descrito que o Resv é capaz de inibir a degranulação de mastócitos, bem como a produção de quimiocinas como CXCL8, CCL2, CCL3, CCL4 e a citocina TNF- α , de maneira dose-dependente (Bilotta, Paruchuru et al. 2021). Apesar dos mastócitos serem teciduais, tais achados exaltam a ampla ação do Resv em diferentes populações celulares.

Considerando o aumento da expectativa de vida mundial, entender os mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias e oxidativas em idosos torna-se essencial. Além disso, o uso de compostos naturais como o Resv mostra relevância, uma vez que este mostra ser um potente agente antioxidante e anti-inflamatório aos estímulos mediados por PAMPs.

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do estudo sobre envelhecimento na pele e em PBMCs permitem concluir que:

- Na pele envelhecida cronologicamente e na pele fotoenvelhecida, houve o aumento da expressão dos genes FGF2 e TIMP1. Possivelmente, tal aumento está relacionado ao reparo tecidual e no controle da degradação de colágeno via MMP, que pode estar associado ao *inflammaging* e ao envelhecimento cutâneo, independentemente do tipo estudado (cronológico ou fotoexposição).
- Em PBMCs, molecularmente, o Resv regulou negativamente genes relacionados a resposta antiviral, possivelmente por reduzir os efeitos inflamatórios da via de IFN.
- O resv levou ao aumento de genes antioxidantes como catalase e SIRT1, indicando que provavelmente a via de sinalização anti-inflamatória no nosso estudo acontece por modulação desta via relacionada a SIRT1.
- A produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e as quimiocinas CCL2 e CCL5 foi diminuída pelo estímulo com Resv, sendo possível concluir e evidenciar seu potencial anti-inflamatório.

A análise do transcriptoma de amostras de pele de pacientes COVID-19 permite concluir que:

- Redes gênicas e vias relacionadas a resposta inflamatória, estresse oxidativo, desmontagem da MEC e ativação das MAPKs mostram genes diferencialmente expressos comparando indivíduos saudáveis e indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2.
- Genes como IL-6, CXCL8, TL4 e genes da família das MMPs chamam atenção pelo aumento expressivo em pacientes COVID-19, sugerindo a presença de inflamação sistêmica também em um contexto cutâneo. No

entanto, tais achados precisam ser melhor elucidados e serão submetidos a validação por imunohistoquímica, para confirmação de sua relevância biológica.

7. REFERÊNCIAS

- Ahmad, S. F., M. A. Ansari, A. Nadeem, S. A. Bakheet, M. Z. Alzahrani, M. A. Alshammari, W. A. Alanazi, A. F. Alasmari and S. M. Attia (2018). "Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T+ Itpr3tf/J autistic mice." European journal of pharmacology **829**: 70-78.
- Albuquerque-Souza, E., K. Crump, K. Rattanaprukskul, Y. Li, B. Shelling, X. Xia-Juan, M. Jiang and S. Sahingur (2022). "TLR9 Mediates Periodontal Aging by Fostering Senescence and Inflammaging." Journal of Dental Research: 00220345221110108.
- Alfonso-Prieto, M., X. Biarnés, P. Vidossich and C. Rovira (2009). "The molecular mechanism of the catalase reaction." Journal of the American Chemical Society **131**(33): 11751-11761.
- Ambrozova, N., J. Ulrichova and A. Galandakova (2017). "Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF- κ B." Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc **161**(1).
- Baugé, C., N. Girard, S. Leclercq, P. Galéra and K. Boumédiene (2012). "Regulatory mechanism of transforming growth factor beta receptor type II degradation by interleukin-1 in primary chondrocytes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1823**(5): 983-986.
- Beak, S. M., Y. S. Lee and J.-A. Kim (2004). "NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor- κ B in HaCaT human keratinocytes." Biochimie **86**(7): 425-429.
- Bekeredjian-Ding, I., S. I. Roth, S. Gilles, T. Giese, A. Ablasser, V. Hornung, S. Endres and G. Hartmann (2006). "T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes." The Journal of Immunology **176**(12): 7438-7446.
- Bernerd, F. and D. Asselineau (1997). "Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro." Developmental biology **183**(2): 123-138.
- Bilotta, S., L. B. Paruchuru, K. Feilhauer, J. Köninger and A. Lorentz (2021). "Resveratrol is a natural inhibitor of human intestinal mast cell activation and phosphorylation of mitochondrial ERK1/2 and STAT3." International journal of molecular sciences **22**(14): 7640.
- Blander, G. and L. Guarente (2004). "The Sir2 family of protein deacetylases." Annual review of biochemistry **73**(1): 417-435.
- Bohara, R. A., N. Tabassum, M. P. Singh, G. Gigli, A. Ragusa and S. Leporatti (2022). "Recent Overview of Resveratrol's Beneficial Effects and Its Nano-Delivery Systems." Molecules **27**(16): 5154.

Boozari, M., A. E. Butler and A. Sahebkar (2019). "Impact of curcumin on toll-like receptors." Journal of cellular physiology **234**(8): 12471-12482.

Boukamp, P. (2001). "Ageing mechanisms: the role of telomere loss." Clinical and experimental dermatology **26**(7): 562-565.

Braicu, C., M. Buse, C. Busuioc, R. Drula, D. Gulei, L. Raduly, A. Rusu, A. Irimie, A. G. Atanasov and O. Slaby (2019). "A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer." Cancers **11**(10): 1618.

Brennan, M., H. Bhatti, K. C. Nerusu, N. Bhagavathula, S. Kang, G. J. Fisher, J. Varani and J. J. Voorhees (2003). "Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin." Photochemistry and photobiology **78**(1): 43-48.

Bruey, J.-M., N. Bruey-Sedano, F. Luciano, D. Zhai, R. Balpai, C. Xu, C. L. Kress, B. Bailly-Maitre, X. Li and A. Osterman (2007). "Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1." Cell **129**(1): 45-56.

Burton, G. J. and E. Jauniaux (2011). "Oxidative stress." Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology **25**(3): 287-299.

Campagna, M. and C. Rivas (2010). "Antiviral activity of resveratrol." Biochemical Society Transactions **38**(1): 50-53.

Cardoso, E. C., N. Z. Pereira, G. E. Mitsunari, L. M. da Silva Oliveira, R. M. S. Ruocco, R. P. V. Francisco, M. Zugaib, A. J. da Silva Duarte and M. N. Sato (2013). "TLR7/TLR8 activation restores defective cytokine secretion by myeloid dendritic cells but not by plasmacytoid dendritic cells in HIV-infected pregnant women and newborns." PloS one **8**(6).

Chen, C.-Y., J.-H. Jang, M.-H. Li and Y.-J. Surh (2005). "Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells." Biochemical and biophysical research communications **331**(4): 993-1000.

Chen, M.-L., J. Li, W.-R. Xiao, L. Sun, H. Tang, L. Wang, L.-Y. Wu, X. Chen and H.-F. Xie (2006). "Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells." Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical sciences **31**(5): 635-639.

Chen, T., Z. Dai, P. Mo, X. Li, Z. Ma, S. Song, X. Chen, M. Luo, K. Liang and S. Gao (2020). "Clinical characteristics and outcomes of older patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Wuhan, China: a single-centered, retrospective study." The Journals of Gerontology: Series A **75**(9): 1788-1795.

Cheng, N., Y. Liang, X. Du and R. D. Ye (2018). "Serum amyloid A promotes LPS clearance and suppresses LPS-induced inflammation and tissue injury." EMBO reports **19**(10): e45517.

Choi, S.-I., H.-S. Han, J.-M. Kim, G. Park, Y.-P. Jang, Y.-K. Shin, H.-S. Ahn, S.-H. Lee and K.-T. Lee (2021). "Eisenia bicyclis Extract Repairs UVB-Induced Skin Photoaging In Vitro and In Vivo: Photoprotective Effects." Marine Drugs **19**(12): 693.

Chung, E. Y., B. H. Kim, J.-T. Hong, C.-K. Lee, B. Ahn, S.-Y. Nam, S.-B. Han and Y. Kim (2011). "Resveratrol down-regulates interferon- γ -inducible inflammatory genes in macrophages: molecular mechanism via decreased STAT-1 activation." The Journal of nutritional biochemistry **22**(10): 902-909.

Coates, M., S. Blanchard and A. S. MacLeod (2018). "Innate antimicrobial immunity in the skin: A protective barrier against bacteria, viruses, and fungi." PLoS pathogens **14**(12): e1007353.

Crocker, S. J., A. Pagenstecher and I. L. Campbell (2004). "The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system." Journal of neuroscience research **75**(1): 1-11.

Cui, X., Y. Ma, H. Wang, J. Huang, L. Li, J. Tang and B. Cheng (2021). "The Anti-photoaging Effects of Pre-and Post-treatment of Platelet-rich Plasma on UVB-damaged HaCaT Keratinocytes." Photochemistry and Photobiology **97**(3): 589-599.

de Souza Andrade, M. M., V. N. Leal, I. G. Fernandes, S. C. Gozzi-Silva, D. R. Beserra, E. A. Oliveira, F. M. Teixeira, T. M. Yendo, M. d. G. T. Sousa and W. R. Teodoro (2022). "Resveratrol Downmodulates Neutrophil Extracellular Trap (NET) Generation by Neutrophils in Patients with Severe COVID-19." Antioxidants **11**(9): 1690.

Dhawan, T., M. A. Zahoor, N. Heryani, S. T. Workenhe, A. Nazli and C. Kaushic (2021). "TRIM26 Facilitates HSV-2 Infection by Downregulating Antiviral Responses through the IRF3 Pathway." Viruses **13**(1): 70.

Di Zazzo, A., M. De Piano, M. Coassin, T. Mori, B. O. Balzamino and A. Micera (2022). "Ocular surface toll like receptors in ageing." BMC ophthalmology **22**(1): 1-9.

Domingues, R., G. C. de Carvalho, V. Aoki, A. J. da Silva Duarte and M. N. Sato (2016). "Activation of myeloid dendritic cells, effector cells and regulatory T cells in lichen planus." Journal of Translational Medicine **14**(1): 1-11.

Domingues, R., A. Pietrobon, G. Carvalho, N. Pereira, N. Pereira, M. N. Sotto, V. Aoki, A. J. d. S. Duarte and M. N. Sato (2019). "Lichen planus: altered AIM 2 and NLRP 1 expression in skin lesions and defective activation in peripheral blood mononuclear cells." Clinical and experimental dermatology **44**(4): e89-e95.

Dong, B., Q. Zhou, J. Zhao, A. Zhou, R. N. Harty, S. Bose, A. Banerjee, R. Slee, J. Guenther and B. R. Williams (2004). "Phospholipid scramblase 1 potentiates the antiviral activity of interferon." Journal of virology **78**(17): 8983-8993.

Dong, K. K., N. Damaghi, S. D. Picart, N. G. Markova, K. Obayashi, Y. Okano, H. Masaki, S. Grether-Beck, J. Krutmann and K. A. Smiles (2008). "UV-induced DNA

damage initiates release of MMP-1 in human skin." Experimental dermatology **17**(12): 1037-1044.

Eckert, J. K., Y. J. Kim, J. I. Kim, K. Gürtler, D.-Y. Oh, S. Sur, L. Lundvall, L. Hamann, A. van der Ploeg and P. Pickkers (2013). "The crystal structure of lipopolysaccharide binding protein reveals the location of a frequent mutation that impairs innate immunity." Immunity **39**(4): 647-660.

Embrechts, W., F. Herschke, F. Pauwels, B. Stoops, S. Last, S. Pieters, V. Pande, G. Pille, K. Amssoms and I. Smyej (2018). "2, 4-Diaminoquinazolines as dual toll-like receptor (TLR) 7/8 modulators for the treatment of hepatitis B virus." Journal of Medicinal Chemistry **61**(14): 6236-6246.

Faith, S. A., T. J. Sweet, E. Bailey, T. Booth and J. J. Docherty (2006). "Resveratrol suppresses nuclear factor- κ B in herpes simplex virus infected cells." Antiviral research **72**(3): 242-251.

Farage, M. A., K. W. Miller, E. Berardesca and H. I. Maibach (2009). "Clinical implications of aging skin." American journal of clinical dermatology **10**(2): 73-86.

Farkhondeh, T., S. L. Folgado, A. M. Pourbagher-Shahri, M. Ashrafizadeh and S. Samarghandian (2020). "The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway." Biomedicine & Pharmacotherapy **127**: 110234.

Fischer, T. W., K. Kleszczyński, L. H. Hardkop, N. Kruse and D. Zillikens (2013). "Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin." Journal of pineal research **54**(3): 303-312.

Fisher, G. J., S. C. Datta, H. S. Talwar, Z.-Q. Wang, J. Varani, S. Kang and J. J. Voorhees (1996). "Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism." Nature **379**(6563): 335-339.

Fitzpatrick, T. B. (1975). "Soleil et peau." J. Med. Esthet. **2**: 33-34.

Franceschi, C., M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence." Annals of the new York Academy of Sciences **908**(1): 244-254.

Gatouillat, G., E. Balasse, D. Joseph-Pietras, H. Morjani and C. Madoulet (2010). "Resveratrol induces cell-cycle disruption and apoptosis in chemoresistant B16 melanoma." Journal of cellular biochemistry **110**(4): 893-902.

Ghareghomi, S., M. Habibi-Rezaei, M. Arese, L. Saso and A. A. Moosavi-Movahedi (2022). "Nrf2 Modulation in Breast Cancer." Biomedicines **10**(10): 2668.

Giacomoni, P. U., L. Declercq, L. Hellemans and D. Maes (2000). "Aging of human skin: review of a mechanistic model and first experimental data." IUBMB life **49**(4): 259-263.

Gianotti, R., S. Veraldi, S. Recalcati, M. Cusini, M. Ghislanzoni, F. Boggio and L. P. Fox (2020). "Cutaneous clinico-pathological findings in three COVID-19-positive patients observed in the metropolitan area of Milan, Italy." Acta dermato-venereologica **100**(6-7): 1-2.

Gilchrest, B. (1996). "A review of skin ageing and its medical therapy." British journal of dermatology **135**(6): 867-875.

Gonzales, K. A. U. and E. Fuchs (2017). "Skin and its regenerative powers: an alliance between stem cells and their niche." Developmental cell **43**(4): 387-401.

Goto, M. (2008). "Inflammaging (inflammation+ aging): A driving force for human aging based on an evolutionarily antagonistic pleiotropy theory?" Bioscience trends **2**(6).

Guerrero-Juarez, C. F. and M. V. Plikus (2018). "Emerging nonmetabolic functions of skin fat." Nature Reviews Endocrinology **14**(3): 163-173.

Hafkamp, F. M., E. W. Taanman-Kueter, T. M. van Capel, E. Wynberg, H. D. van Willigen, A. Verveen, N. A. Kootstra, P. Nieuwkerk, M. D. de Jong and G. J. de Bree (2023). "Aberrant neutrophil degranulation in hospitalized patients with COVID-19 partially remains for six months." European Journal of Immunology: 2350404.

Handfield, C., J. Kwock and A. S. MacLeod (2018). "Innate antiviral immunity in the skin." Trends in immunology **39**(4): 328-340.

Harant, H. and I. J. Lindley (2004). "Negative cross-talk between the human orphan nuclear receptor Nur77/NAK-1/TR3 and nuclear factor- κ B." Nucleic acids research **32**(17): 5280-5290.

He, Z., Y. Li, T. Xiong, X. Nie, H. Zhang and C. Zhu (2022). "Effect of dietary resveratrol supplementation on growth performance, antioxidant capacity, intestinal immunity and gut microbiota in yellow-feathered broilers challenged with lipopolysaccharide." Frontiers in Microbiology **13**.

Hedou, M., F. Carsuzaa, E. Chary, E. Hainaut, F. Cazenave-Roblot and M. Masson Regnault (2020). "Comment on 'Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective' by Recalcati S." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **34**(7): e299-e300.

Hellemans, L., H. Corstjens, A. Neven, L. Declercq and D. Maes (2003). "Antioxidant enzyme activity in human stratum corneum shows seasonal variation with an age-dependent recovery." Journal of investigative dermatology **120**(3): 434-439.

Hodge, G., H. B. Tran, P. N. Reynolds, H. Jersmann and S. Hodge (2020). "Lymphocyte senescence in COPD is associated with decreased sirtuin 1 expression in steroid resistant pro-inflammatory lymphocytes." Therapeutic advances in respiratory disease **14**: 1753466620905280.

- Holland, R. and J. C. Fishbein (2010). "Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1." Antioxidants & redox signaling **13**(11): 1749-1761.
- Honda, A., R. Abe, T. Makino, O. Norisugi, Y. Fujita, H. Watanabe, J. Nishihira, Y. Iwakura, S.-i. Yamagishi and H. Shimizu (2008). "Interleukin-1 β and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression." Journal of dermatological science **49**(1): 63-72.
- Hu, B., S. Huang and L. Yin (2021). "The cytokine storm and COVID-19." Journal of medical virology **93**(1): 250-256.
- Huang, H. (2018). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances." Sensors **18**(10): 3249.
- Hugenschmidt, C., T. Duran and M. Espeland (2021). "Interactions between estradiol, diabetes, and brain aging and the risk for cognitive impairment." Climacteric **24**(4): 359-365.
- Ichihashi, M., M. Ueda, A. Budiyo, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru and T. Horikawa (2003). "UV-induced skin damage." Toxicology **189**(1-2): 21-39.
- Ishizaki, J., N. Suzuki, K.-i. Higashino, Y. Yokota, T. Ono, K. Kawamoto, N. Fujii, H. Arita and K. Hanasaki (1999). "Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A2s." Journal of Biological Chemistry **274**(35): 24973-24979.
- Jenkins, G. (2002). "Molecular mechanisms of skin ageing." Mechanisms of ageing and development **123**(7): 801-810.
- Jiang, H., X. Zhou and L. Chen (2022). "Asiaticoside delays senescence and attenuate generation of ROS in UV-exposure cells through regulates TGF- β 1/Smad pathway." Experimental and Therapeutic Medicine **24**(5): 1-13.
- Jung, J. M., O. Y. Kwon, J. K. Choi and S. H. Lee (2022). "Alpinia officinarum Rhizome ameliorates the UVB induced photoaging through attenuating the phosphorylation of AKT and ERK." BMC Complementary Medicine and Therapies **22**(1): 1-12.
- Kammeyer, A. and R. Luiten (2015). "Oxidation events and skin aging." Ageing research reviews **21**: 16-29.
- Kang, N., Y. Shi, J. Song, F. Gao, M. Fan, W. Jin, Y. Gao and P. Lv (2022). "Resveratrol reduces inflammatory response and detrimental effects in chronic cerebral hypoperfusion by down-regulating stimulator of interferon genes/TANK-binding kinase 1/interferon regulatory factor 3 signaling." Frontiers in aging neuroscience **14**.
- Karin, M., Z.-g. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." Current opinion in cell biology **9**(2): 240-246.

Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." Immunity **34**(5): 637-650.

Kawamura, T., Y. Ogawa, R. Aoki and S. Shimada (2014). "Innate and intrinsic antiviral immunity in skin." Journal of dermatological science **75**(3): 159-166.

Kim, C., H.-C. Ryu and J.-H. Kim (2010). "Low-dose UVB irradiation stimulates matrix metalloproteinase-1 expression via a BLT2-linked pathway in HaCaT cells." Experimental & molecular medicine **42**(12): 833-841.

Kim, J.-A., S.-K. Park, M. Kumar, C.-H. Lee and O. S. Shin (2015). "Insights into the role of immunosenescence during varicella zoster virus infection (shingles) in the aging cell model." Oncotarget **6**(34): 35324.

Kinn, P. M., G. O. Holdren, B. A. Westermeyer, M. Abuissa, C. L. Fischer, J. A. Fairley, K. A. Brogden and N. K. Brogden (2015). "Age-dependent variation in cytokines, chemokines and biologic analytes rinsed from the surface of healthy human skin." Scientific reports **5**(1): 1-8.

Klein, T. and R. Bischoff (2011). "Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases." Amino acids **41**(2): 271-290.

Knäuper, V., S. Cowell, B. Smith, C. López-Otin, M. O'Shea, H. Morris, L. Zardi and G. Murphy (1997). "The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction." Journal of Biological Chemistry **272**(12): 7608-7616.

Kotnik, V. (2011). "Complement in skin diseases." Acta Dermatoven APA **20**(1): 1-11.
Kubo, A., K. Nagao, M. Yokouchi, H. Sasaki and M. Amagai (2009). "External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers." Journal of Experimental Medicine **206**(13): 2937-2946.

Kähäri, V. M. and U. Saarialho-Kere (1997). "Matrix metalloproteinases in skin." Experimental dermatology **6**(5): 199-213.

Lang, R., M. Hammer and J. r. Mages (2006). "DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response." The Journal of Immunology **177**(11): 7497-7504.

Lançon, A., J. J. Michaille and N. Latruffe (2013). "Effects of dietary phytophenols on the expression of microRNAs involved in mammalian cell homeostasis." Journal of the Science of Food and Agriculture **93**(13): 3155-3164.

Le Dreau, G., L. Kular, A. Nicot, C. Calmel, S. Melik-Parsadaniantz, P. Kitabgi, M. Laurent and C. Martinerie (2010). "NOV/CCN3 upregulates CCL2 and CXCL1 expression in astrocytes through β 1 and β 5 integrins." Glia **58**(12): 1510-1521.

Leonardi, A., R. Cortivo, I. Fregona, M. Plebani, A. G. Secchi and G. Abatangelo (2003). "Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP1 in

conjunctival fibroblasts." Investigative Ophthalmology & Visual Science **44**(1): 183-189.

Lephart, E. D. (2016). "Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms." Ageing Research Reviews **31**: 36-54.

Lephart, E. D. and F. Naftolin (2021). "Menopause and the skin: Old favorites and new innovations in cosmeceuticals for estrogen-deficient skin." Dermatology and Therapy **11**(1): 53-69.

Li, C., W. Liu, F. Wang, T. Hayashi, K. Mizuno, S. Hattori, H. Fujisaki and T. Ikejima (2021). "DNA damage-triggered activation of cGAS-STING pathway induces apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells." Molecular Immunology **131**: 180-190.

Libby, P., Y. Okamoto, V. Z. Rocha and E. Folco (2010). "Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice." Circulation journal **74**(2): 213-220.

Lima, J. F., L. M. Oliveira, N. Z. Pereira, A. J. Duarte and M. N. Sato (2017). "Polyfunctional natural killer cells with a low activation profile in response to Toll-like receptor 3 activation in HIV-1-exposed seronegative subjects." Scientific reports **7**(1): 1-9.

Lin, Z., V. Natesan, H. Shi, A. Hamik, D. Kawanami, C. Hao, G. H. Mahabaleshwar, W. Wang, Z.-G. Jin and G. B. Atkins (2010). "A novel role of CCN3 in regulating endothelial inflammation." Journal of cell communication and signaling **4**: 141-153.

Liu, T., N. Zang, N. Zhou, W. Li, X. Xie, Y. Deng, L. Ren, X. Long, S. Li and L. Zhou (2014). "Resveratrol inhibits the TRIF-dependent pathway by upregulating sterile alpha and armadillo motif protein, contributing to anti-inflammatory effects after respiratory syncytial virus infection." Journal of Virology **88**(8): 4229-4236.

Llamas-Velasco, M., J. Fraga, A. R.-V. Lario, A. Catalá, Y. C. Pérez-González, C. Galván, R. Ruiz-Villaverde, J. Sánchez-Pérez, T. Wiesner and D. Metze (2023). "A series of 69 COVID-related dermatoses with biopsy, immunohistochemistry with anti-Spike 3, in situ hybridization and PCR: a critical reappraisal of viral involvement in COVID-19 skin lesions." Actas Dermo-sifiliograficas.

Lu, F., M. Zahid, C. Wang, M. Saeed, E. L. Cavalieri and E. G. Rogan (2008). "Resveratrol prevents estrogen-DNA adduct formation and neoplastic transformation in MCF-10F cells." Cancer Prevention Research **1**(2): 135-145.

Mahé, A., E. Birckel, S. Krieger, C. Merklen and L. Bottlaender (2020). "A distinctive skin rash associated with coronavirus disease 2019?" Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **34**(6): e246-e247.

Manchope, M. F., C. Calixto-Campos, L. Coelho-Silva, A. C. Zarpelon, F. A. Pinho-Ribeiro, S. R. Georgetti, M. M. Baracat, R. Casagrande and W. A. Verri Jr (2016). "Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the NO- cGMP- PKG- KATPChannel signaling pathway." PloS one **11**(4): e0153015.

Manfrere, K. C., M. P. Torrealba, D. R. Miyashiro, L. Oliveira, G. C. d. CARVALHO, J. F. Lima, A. C. C. Branco, N. Z. Pereira, J. Pereira and J. A. Sanches Jr (2016). "Toll-like receptor agonists partially restore the production of pro-inflammatory cytokines and type I interferon in Sézary syndrome." Oncotarget.

Mantovani, A., M. A. Cassatella, C. Costantini and S. Jaillon (2011). "Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity." Nature reviews immunology **11**(8): 519-531.

Marzano, A. V., G. Genovese, G. Fabbrocini, P. Pigatto, G. Monfrecola, B. M. Piraccini, S. Veraldi, P. Rubegni, M. Cusini and V. Caputo (2020). "Varicella-like exanthem as a specific COVID-19-associated skin manifestation: Multicenter case series of 22 patients." Journal of the American Academy of Dermatology **83**(1): 280-285.

McCubrey, J. A., K. Lertpiriyapong, L. S. Steelman, S. L. Abrams, L. V. Yang, R. M. Murata, P. L. Rosalen, A. Scalisi, L. M. Neri and L. Cocco (2017). "Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs." Aging (Albany NY) **9**(6): 1477.

Mitchell, D. and C. Olive (2010). "Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases." Molecular immunology **47**(11-12): 2065-2073.

Mohd, A., N. Zainal, K.-K. Tan and S. AbuBakar (2019). "Resveratrol affects Zika virus replication in vitro." Scientific reports **9**(1): 14336.

Moore, K. J. and I. Tabas (2011). "Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis." Cell **145**(3): 341-355.

Morales, I., G. Farías and R. B. Maccioni (2010). "Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Neuroimmunomodulation **17**(3): 202-204.

Morpheus. from <https://software.broadinstitute.org/morpheus>.

Morris, R., N. J. Kershaw and J. J. Babon (2018). "The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway." Protein Science **27**(12): 1984-2009.

Nahum, A., H. Dadi, A. Bates and C. M. Roifman (2012). "The biological significance of TLR3 variant, L412F, in conferring susceptibility to cutaneous candidiasis, CMV and autoimmunity." Autoimmunity reviews **11**(5): 341-347.

Najarian, D. J. (2020). "Morbilliform exanthem associated with COVID-19." JAAD case reports **6**(6): 493.

Navarrete-Reyes, A. P. and M. Montana-Alvarez (2009). "Inflammaging Aging inflammatory origin." Revista de Investigación Clínica **61**(4): 327-336.

- Noh, K. T., J. Cho, S. H. Chun, J.-H. Jang, G. S. Cha, I. D. Jung, D. D. Jang and Y.-M. Park (2015). "Resveratrol regulates naïve CD 8+ T-cell proliferation by upregulating IFN- γ -induced tryptophanyl-tRNA synthetase expression." BMB reports **48**(5): 283.
- O'Neill, L. A., D. Golenbock and A. G. Bowie (2013). "The history of Toll-like receptors—redefining innate immunity." Nature Reviews Immunology **13**(6): 453-460.
- OMS. (2022). 2022, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>.
- Panichakul, T., S. Ponnikorn, W. Tupchiangmai, W. Haritakun and K. Srisanga (2022). "Skin Anti-Aging Potential of Ipomoea pes-caprae Ethanolic Extracts on Promoting Cell Proliferation and Collagen Production in Human Fibroblasts (CCD-986sk Cells)." Pharmaceuticals **15**(8): 969.
- Papaccio, F., A. D' Arino, S. Caputo and B. Bellei (2022). "Focus on the contribution of oxidative stress in skin aging." Antioxidants **11**(6): 1121.
- Pasinetti, G. M., J. Wang, L. Ho, W. Zhao and L. Dubner (2015). "Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease **1852**(6): 1202-1208.
- Pietrobon, A. J., F. S. Yoshikawa, L. M. Oliveira, N. Z. Pereira, T. Matozo, B. C. de Alencar, A. J. Duarte and M. N. Sato (2022). "Antiviral Response Induced by Toll-Like Receptor (TLR) 7/TLR8 Activation Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in Cord Blood Macrophages." The Journal of Infectious Diseases **225**(3): 510-519.
- Podda, M. and M. Grundmann-Kollmann (2001). "Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing." Clinical and experimental dermatology **26**(7): 578-582.
- Puizina-Ivic, N. (2008). "Skin aging." Acta Dermatovenerologica Alpina Panonica Et Adriatica **17**(2): 47.
- Qi, J., L.-Y. Fu, K.-L. Liu, R.-J. Li, J.-A. Qiao, X.-J. Yu, J.-Y. Yu, Y. Li, Z.-P. Feng and Q.-Y. Yi (2022). "Resveratrol in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus Attenuates Hypertension by Regulation of ROS and Neurotransmitters." Nutrients **14**(19): 4177.
- Quan, T., T. He, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2005). "Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts." Journal of Biological Chemistry **280**(9): 8079-8085.
- Rafat, Z., S. Hashemi, K. Ahamdikia, R. D. Ghazvini and F. Bazvandi (2017). "Study of skin and nail Candida species as a normal flora based on age groups in healthy persons in Tehran-Iran." Journal de Mycologie Médicale **27**(4): 501-505.
- Recalcati, S. (2020). "Cutaneous manifestations in COVID-19: a first perspective." Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology **34**(5): e212-e213.

Rinnerthaler, M., J. Bischof, M. K. Streubel, A. Trost and K. Richter (2015). "Oxidative stress in aging human skin." Biomolecules **5**(2): 545-589.

Robinson, M. K. (1999). "Population differences in skin structure and physiology and the susceptibility to irritant and allergic contact dermatitis: implications for skin safety testing and risk assessment." Contact Dermatitis **41**(2): 65-79.

Ruhrberg, C., M. Hajibagheri, M. Simon, T. P. Dooley and F. M. Watt (1996). "Envoplakin, a novel precursor of the cornified envelope that has homology to desmoplakin." The Journal of cell biology **134**(3): 715-729.

Rydzynska, Z., B. Pawlik, D. Krzyzanowski, W. Mlynarski and J. Madzio (2021). "Neutrophil elastase defects in congenital neutropenia." Frontiers in Immunology **12**: 1382.

Salvioli, S., D. Monti, C. Lanzarini, M. Conte, C. Pirazzini, M. Giulia Bacalini, P. Garagnani, C. Giuliani, E. Fontanesi and R. Ostan (2013). "Immune system, cell senescence, aging and longevity-inflamm-aging reappraised." Current Pharmaceutical Design **19**(9): 1675-1679.

Santos, M. A., F. N. Franco, C. A. Caldeira, G. R. de Araújo, A. Vieira, M. M. Chaves and R. C. Lara (2021). "Antioxidant effect of Resveratrol: Change in MAPK cell signaling pathway during the aging process." Archives of Gerontology and Geriatrics **92**: 104266.

Scharffetter–Kochanek, K., P. Brenneisen, J. Wenk, G. Herrmann, W. Ma, L. Kuhr, C. Meewes and M. Wlaschek (2000). "Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms." Experimental gerontology **35**(3): 307-316.

Shin, M. H., G.-e. Rhie, Y. K. Kim, C.-H. Park, K. H. Cho, K. H. Kim, H. C. Eun and J. H. Chung (2005). "H₂O₂ accumulation by catalase reduction changes MAP kinase signaling in aged human skin in vivo." Journal of investigative dermatology **125**(2): 221-229.

Somerville, D. A. (1969). "The normal flora of the skin in different age groups." British Journal of Dermatology **81**(4): 248-258.

Sparn, C., E. Dimou, A. Meyer, R. Saleppico, S. Wegehngel, M. Gerstner, S. Klaus, H. Ewers and W. Nickel (2022). "Glypican-1 drives unconventional secretion of fibroblast growth factor 2." Elife **11**: e75545.

Taguchi, T. and K. Mukai (2019). "Innate immunity signalling and membrane trafficking." Current opinion in cell biology **59**: 1-7.

Takabayashi, Y., M. Kuwabara, Y. Sato, M. Ishihara, M. Takikawa, S. Nakamura, K. Fukuda, S. Hiruma and T. Kiyosawa (2018). "FGF2-containing dalteparin/protamine nanoparticles (FGF2&D/P NPs) ameliorate UV-induced skin photoaging in hairless mice." Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery **52**(6): 375-381.

- Takeda, K. and S. Akira (2015). "Toll-like receptors." Current protocols in immunology **109**(1): 14.12. 11-14.12. 10.
- Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annual review of immunology **21**: 335.
- Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghayeb, K. A. Reimann, R. H. Purcell and F. V. Chisari (2003). "CD8+ T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection." Journal of virology **77**(1): 68-76.
- Timmers, S., J. Auwerx and P. Schrauwen (2012). "The journey of resveratrol from yeast to human." Aging (alban NY) **4**(3): 146.
- Tong, W., X. Chen, X. Song, Y. Chen, R. Jia, Y. Zou, L. Li, L. Yin, C. He and X. Liang (2020). "Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4-NF- κ B/MAPKs/IRF3." Experimental and Therapeutic Medicine **19**(3): 1824-1834.
- Truong, V.-L., R. H. Rarison and W.-S. Jeong (2022). "Protective Effects of Orange Sweet Pepper Juices Prepared by High-Speed Blender and Low-Speed Masticating Juicer against UVB-induced Skin Damage in SKH-1 Hairless Mice." Molecules **27**(19): 6394.
- Tzeng, H. E., J. C. Chen, C. H. Tsai, C. C. Kuo, H. C. Hsu, W. L. Hwang, Y. C. Fong and C. H. Tang (2011). "CCN3 increases cell motility and MMP-13 expression in human chondrosarcoma through integrin-dependent pathway." Journal of cellular physiology **226**(12): 3181-3189.
- Vaure, C. and Y. Liu (2014). "A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species." Frontiers in immunology **5**: 316.
- Wang, D., S.-P. Li, J.-S. Fu, L. Bai and L. Guo (2016). "Resveratrol augments therapeutic efficiency of mouse bone marrow mesenchymal stem cell-based therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis." International journal of developmental neuroscience **49**: 60-66.
- Wang, J.-M., C.-Y. Ko, L.-C. Chen, W.-L. Wang and W.-C. Chang (2006). "Functional role of NF-IL6 β and its sumoylation and acetylation modifications in promoter activation of cyclooxygenase 2 gene." Nucleic acids research **34**(1): 217-231.
- Wang, Z.-L., X.-F. Luo, M.-T. Li, D. Xu, S. Zhou, H.-Z. Chen, N. Gao, Z. Chen, L.-L. Zhang and X.-F. Zeng (2014). "Resveratrol possesses protective effects in a pristane-induced lupus mouse model." PLoS One **9**(12): e114792.
- Weiherrmann, A., M. Lorencini, C. Brohem and C. De Carvalho (2017). "Elastin structure and its involvement in skin photoageing." International journal of cosmetic science **39**(3): 241-247.
- Weiss, R. A. (2013). "Autologous cell therapy: will it replace dermal fillers?" Facial Plastic Surgery Clinics **21**(2): 299-304.

Wlaschek, M., I. Tantcheva-Poór, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schüller and K. Scharffetter-Kochanek (2001). "Solar UV irradiation and dermal photoaging." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **63**(1-3): 41-51.

Wolf, J., B. Weinberger, C. R. Arnold, A. B. Maier, R. G. Westendorp and B. Grubeck-Loebenstein (2012). "The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts." Experimental gerontology **47**(9): 749-753.

Yang, M., J. Wei, T. Huang, L. Lei, C. Shen, J. Lai, M. Yang, L. Liu, Y. Yang and G. Liu (2021). "Resveratrol inhibits the replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in cultured Vero cells." Phytotherapy Research **35**(3): 1127.

Yang, X., W.-B. Dong, X.-P. Lei, Q.-P. Li, L.-Y. Zhang and L.-P. Zhang (2018). "Resveratrol suppresses hyperoxia-induced nucleocytoplasmic shuttling of SIRT1 and ROS production in PBMC from preterm infants in vitro." The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine **31**(9): 1142-1150.

Yap, W. N. (2018). "Tocotrienol-rich fraction attenuates UV-induced inflammaging: A bench to bedside study." Journal of cosmetic dermatology **17**(3): 555-565.

Yuksel Egrilmez, M., S. Kocturk, S. Aktan, G. Oktay, H. Resmi, H. Simsek Keskin, G. Guner Akdogan and S. Ozkan (2022). "Melatonin Prevents UVB-Induced Skin Photoaging by Inhibiting Oxidative Damage and MMP Expression through JNK/AP-1 Signaling Pathway in Human Dermal Fibroblasts." Life **12**(7): 950.

Zhang, J., Y. Zheng, B. Hong, L. Ma, Y. Zhao, S. Zhang, S. Sun, Q. Ding, Y. Wang and W. Liu (2022). "Dihydroquercetin composite nanofibrous membrane prevents UVA radiation-mediated inflammation, apoptosis and oxidative stress by modulating MAPKs/Nrf2 signaling in human epidermal keratinocytes." Biomedicine & Pharmacotherapy: 113727.

Zhang, Q., H. Huang, F. Zheng, H. Liu, F. Qiu, Y. Chen, C.-L. Liang and Z. Dai (2020). "Resveratrol exerts antitumor effects by downregulating CD8+ CD122+ Tregs in murine hepatocellular carcinoma." Oncoimmunology **9**(1): 1829346.

Zhou, Y., B. Fu, X. Zheng, D. Wang, C. Zhao, Y. Qi, R. Sun, Z. Tian, X. Xu and H. Wei (2020). "Aberrant pathogenic GM-CSF+ T cells and inflammatory CD14+ CD16+ monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus." bioRxiv: 2020.2002.2012.945576.

Zhou, Z. X., S. F. Mou, X. Q. Chen, L. L. Gong and W. S. Ge (2018). "Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- κ B in animal models of acute pharyngitis." Molecular medicine reports **17**(1): 1269-1274.

Zhuang, Y. and J. Lyga (2014). "Inflammaging in skin and other tissues-the roles of complement system and macrophage." Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued) **13**(3): 153-161.

Zizzo, G., A. Tamburello, L. Castelnovo, A. Laria, N. Mumoli, P. M. Faggioli, I. Stefani and A. Mazzone (2022). "Immunotherapy of COVID-19: Inside and beyond IL-6 signalling." Frontiers in Immunology **13**: 795315.

Švajger, U. and M. Jeras (2012). "Anti-inflammatory effects of resveratrol and its potential use in therapy of immune-mediated diseases." International reviews of immunology **31**(3): 202-222.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ENVELHECIMENTO CUTÂNEO: ESTRESSE OXIDATIVO MITOCONDRIAL E EFEITO DE ANTIOXIDANTES NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE FIBROBLASTOS **Pesquisador:** Maria Notomi Sato **Área Temática:**

Versão: 6

CAAE: 16145719.8.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.807.781

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado que consistirá em um estudo experimental prospectivo, a ser realizado em seres humanos, intitulado “Envelhecimento cutâneo: estresse oxidativo mitocondrial e efeito de antioxidantes na resposta inflamatória de fibroblastos”. O estudo incluirá voluntárias saudáveis jovens entre 20 e 40 anos (n=20) e idosas com idade igual ou superior a 60 anos (n=20) recrutadas no HCFMUSP. As participantes serão submetidas a biópsia para obtenção de fragmento de pele de 6 mm de área fotoexposta, além da coleta de 4 mL de amostra de sangue.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa tem por objetivo avaliar o envelhecimento cutâneo quanto à expressão de fatores oxidantes e antioxidantes, o estresse oxidativo mitocondrial e as vias de ativação celular após estímulo pró-inflamatório. Para tanto, serão realizadas culturas primárias de fibroblastos obtidos a partir do fragmento de pele de cada participante do grupo de idosas e do grupo controle. Os grupos serão comparados quanto ao estresse oxidativo, a ativação da matriz extracelular, à resposta a estímulos pró-inflamatórios e o efeito de substâncias antioxidantes no estresse oxidativo mitocondrial e sistema redox dos fibroblastos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos envolvidos na pesquisa referem-se à coleta do material biológico (fragmento de pele e

amostra de sangue) necessário para o estudo do envelhecimento cutâneo, e potenciais complicações decorrentes dos procedimentos para sua obtenção. Tais riscos encontram-se descritos no termo de consentimento livre e esclarecido. Não haverá benefícios diretos às participantes do projeto, porém os resultados do estudo poderão contribuir significativamente para o melhor entendimento dos mecanismos de envelhecimento cutâneo e de maneiras para interferir nesse processo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa com tema extremamente relevante frente ao aumento da expectativa de vida populacional. Os resultados do estudo poderão esclarecer como as vias de oxidação e inflamação celular se alteram com o envelhecimento cutâneo e o papel de substâncias com potencial antioxidante e antiinflamatório na regulação desse processo. Os autores do estudo demonstram conhecimento e domínio das técnicas a serem utilizadas para atingir os objetivos do projeto e apresentam fonte financiadora para sua execução.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória encontram-se adequados.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1324276.pdf	16/12/2019 16:42:19		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Profa_Maria_Sato.pdf	16/12/2019 16:32:57	Maria Notomi Sato	Aceito
Cronograma	cronograma_doutorado.pdf	16/12/2019 16:15:02	Maria Notomi Sato	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_pesquisa.pdf	18/11/2019 15:33:56	Maria Notomi Sato	Aceito

Continuação do Parecer: 3.807.781

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_corrigido.docx	18/11/2019 15:26:06	Maria Notomi Sato	Aceito
--------------------------------------------------	---------------------	------------------------	-------------------	--------

Página 02 de

Ausência	TCLE_corrigido.docx	18/11/2019 15:26:06	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	formulario_CEP_assinado.pdf	07/10/2019 14:37:19	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	Formulario_CEP_corrigido_pt3.jpg	14/08/2019 10:55:15	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	Formulario_CEP_corrigido_pt2.jpg	14/08/2019 10:54:46	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	Formulario_CEP_corrigido.jpg	14/08/2019 10:54:25	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	Formulario_cadastro_CEP.docx	13/06/2019 15:17:03	Maria Notomi Sato	Aceito
Outros	CEP_Formulario.pdf	29/04/2019 01:57:14	Maria Notomi Sato	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	15/04/2019 03:11:36	Maria Notomi Sato	Aceito
Orçamento	Orcamento_Doutorado.docx	15/04/2019 03:10:50	Maria Notomi Sato	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_Biorrepositorio.pdf	12/04/2019 15:28:18	Maria Notomi Sato	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Doutorado.docx	12/04/2019 15:21:52	Maria Notomi Sato	Aceito
Cronograma	Cronograma_Doutorado_lara.pdf	12/04/2019 15:20:56	Maria Notomi Sato	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_Doutorado_lara.pdf	12/04/2019 15:20:46	Maria Notomi Sato	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 23 de Janeiro de 2020

Assinado por: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (Coordenador(a))

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (FMUSP)
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:

IDADE:.....

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:

RUA Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (....).....

FAZ USO DE ALGUM MEDICAMENTO, MESMO QUE DE ORIGEM NATURAL OU DE SUPLEMENTAÇÃO? SE SIM, QUAL?

.....

FAZ USO DE ANTICONCEPCIONAL? SE SIM, QUAL?

.....

REALIZA REPOSIÇÃO HORMONAL? SE SIM, QUAL MEDICAMENTO UTILIZA?

.....

POSSUI ALGUMA DOENÇA? SE SIM, QUAL?

.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Envelhecimento cutâneo: estresse oxidativo mitocondrial e efeito de antioxidantes na resposta inflamatória de fibroblastos”

PESQUISADOR: Maria Notomi Sato

CARGO/FUNÇÃO: Professora Doutora – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

UNIDADE DO HCFMUSP: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo” / Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

PESQUISADORES ENVOLVIDOS: Iara Grigoletto Fernandes e Amadeu José Rodrigues Queiroz

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	()	RISCO MÉDIO	()
RISCO BAIXO	(x)	RISCO MAIOR	()

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

4 – Apresentação:

Convidamos a senhora a participar de uma pesquisa científica. Esta pesquisa tem como objetivo estudar e entender melhor os mecanismos envolvidos no envelhecimento da pele. As descobertas encontradas neste trabalho não trarão benefícios diretos ao participante da pesquisa, afinal, estudos científicos baseiam-se na análise de grande número de amostras e os resultados possivelmente não sejam divulgados tão rapidamente. Porém, é muito importante lembrar que podem no futuro ser úteis para muitas pessoas e para a ciência como um todo.

Para decidir se aceita ou não participar desta pesquisa, será esclarecido à senhora os riscos e benefícios, para que possa fazer um julgamento consciente. Inicialmente explicaremos as razões da pesquisa.

Procedimento, riscos e benefícios:

Sabendo de todos os acontecimentos envolvidos no envelhecimento da pele, este projeto de pesquisa irá estudar e comparar células da pele de voluntárias jovens (20-35 anos) e idosas (idade igual ou superior a 60 anos). Portanto, solicitamos à senhora permissão para coletar duas amostras de pele da região das nádegas (por ser uma região que não sofreu ações de raios solares), cada uma com o tamanho de 3mm de diâmetro (aproximadamente o tamanho de um grão de arroz) e uma amostra de sangue de 4 mL (aproximadamente 1 colher de sopa). Para a biópsia na pele, a senhora receberá anestesia local, mas mesmo assim pode sentir um leve desconforto. Por ser uma biópsia muito pequena, não há a necessidade de dar pontos de sutura na região, porém, se a senhora se sentir mais confortável recebendo pontos, poderá ser solicitado. Os efeitos colaterais da coleta da biópsia de pele podem incluir dor, sangramento local, pressão baixa e, em casos mais raros, infecção ou formação de quelóide. Os efeitos colaterais da coleta de sangue podem incluir dor, sangramento, hematoma e, em casos mais raros, infecção.

Forma de acompanhamento e assistência:

A senhora será acompanhada por um médico dermatologista e pelos pesquisadores, ambos envolvidos nesta pesquisa durante o estudo e após o término do mesmo.

Em qualquer etapa do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa. O investigador principal é Dra. Maria Notomi Sato, que pode ser encontrado no Instituto de Medicina Tropical, Prédio II, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, número 500. Telefones: 3061-7499/3061-7457. O investigador executante é Iara Grigoletto Fernandes, que pode ser encontrado Instituto de Medicina Tropical,

Prédio II, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, número 500. Telefones: 3061-7499/3061-7457.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000, horário de atendimento: 8:00-17:00h; Tel: (11) 3893-4401/4407 E-mail: cep.fm@usp.br

Garantia de Ressarcimento

A senhora não terá qualquer custo, pois o custo desta pesquisa será de responsabilidade do orçamento da pesquisa. A senhora tem direito a ressarcimento em caso de despesas decorrentes da sua participação na pesquisa.

Garantia de indenização

A senhora tem direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

De acordo com a resolução Nº466 do Ministério da Saúde, você pode retirar este consentimento e desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na instituição. Todas as informações obtidas serão mantidas em sigilo, seu nome e das demais pacientes não será divulgado em nenhuma publicação, e os dados serão utilizados exclusivamente para os fins científicos. Você poderá se manter atualizada sobre os resultados parciais desta pesquisa, podendo questionar a qualquer momento sobre as informações obtidas ou dos resultados que sejam do conhecimento do pesquisador. Não há despesas pessoais para você caso decida participar. Também não há compensação financeira.

É importante ainda esclarecer que será criado um biorrepositório, com possível transferência do material biológico para um biobanco. Caso os materiais coletados para este estudo sejam utilizados futuramente neste ou em outro estudo, a senhora pode solicitar que seja contatada para autorizar o uso desse material biológico coletado e armazenado. **Em relação ao armazenamento e guarda do material coletado mesmo após o fim da pesquisa, eu:**

Autorizo o armazenamento e guarda do material por até 10 anos, porém desejo ser contatada se for utilizado futuramente e/ou em outro estudo

Autorizo o armazenamento e guarda do material por até 10 anos, mas não há necessidade de ser contatada se for utilizado futuramente e/ou em outro estudo

Não autorizo o armazenamento e guarda do material por até 10 anos.

Fui também informada que a prorrogação do tempo de armazenamento do material será autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas na Pesquisa “Envelhecimento cutâneo: estresse oxidativo mitocondrial e efeito de antioxidantes na resposta inflamatória de fibroblastos”, após justificativas feitas pelos

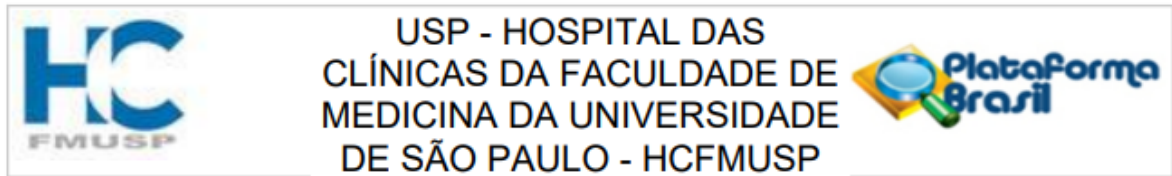
pesquisadores. Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Data __/__/__

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável

Data __/__/__

Rubrica do pesquisador



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias **Pesquisador:** Alberto José da Silva Duarte

Área Temática: Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 30800520.7.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.983.577

Apresentação do Projeto:

Projeto novo: Avaliação de fatores preditivos e biomarcadores na infecção por COVID 19: polimorfismos genéticos e sinalização de vias inflamatórias.

Objetivo da Pesquisa:

A pesquisa envolve especialmente marcadores imunológicos associados a infecção pelo covid-19. Especialmente polimorfismos relacionado a genética dos indivíduos acometidos por esta doença. Entre eles: A proposta é o entendimento da patogênese de marcadores moleculares como polimorfismos de receptor/citocinas, vias de sinalização envolvidos no reconhecimento viral, bem como no grau de afinidade de anticorpos, que em conjunto podem ser fatores preditivos para o desfecho da doença, apontando sua gravidade. 1. Perfil de resposta pró-inflamatória plasmática: serão avaliados no plasma dos pacientes os níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL6, TNF- IL-1, CXCL10, CCL2, CCL4, CCL3, CXCL8, VEGF), reguladoras (TGF1, IL-10) e também os níveis solúveis de endogлина.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Haverá coleta de sangue de 60 pacientes. Serão estudados pacientes com diferentes graus da doença, desde assintomáticos, pacientes com variados graus de acometimento e também análise

Página 01 de

Continuação do Parecer: 3.983.577

de necrópsia (pele) de 10 pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Estudos de marcadores imunológicos é importante sem dúvida em uma doença onde o acometimento clínico é muito variado. E o conhecimento destas características pode contribuir para a pesquisa de imunomoduladores. Tal fato também será pesquisado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. TCLE é bem descrito e informativo. Anuência do SVO também está presente.

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há Inadequações

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1541402.pdf	17/04/2020 12:33:53		Aceito

Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	17/04/2020 12:32:19	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Outros	declaracao_sempatrocinio.pdf	17/04/2020 08:19:51	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoSVO.pdf	17/04/2020 08:17:34	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Declaração de concordância	carta_anuencia_DLC.pdf	17/04/2020 08:16:37	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_COVID_controle.doc	17/04/2020 08:16:08	Alberto José da Silva Duarte	Aceito

Página 02 de

Continuação do Parecer: 3.983.577

Justificativa de Ausência	TCLE_COVID_controle.doc	17/04/2020 08:16:08	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_COVID.doc	17/04/2020 08:15:57	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_COVID_LIM56_CapPesq.docx	17/04/2020 08:15:08	Alberto José da Silva Duarte	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_DE_EXECUCAO.docx	17/04/2020 08:14:11	Alberto José da Silva Duarte	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Abril de 2020

**Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))**