

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas- Departamento de Bioquímica e Imunologia

Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Monique Macedo Coelho

**O IMPACTO DO MEIO AMBIENTE NAS ASSINATURAS DA
IMUNOSSENESCÊNCIA**

Belo Horizonte

2025

Monique Macedo Coelho

**O IMPACTO DO MEIO AMBIENTE NAS ASSINATURAS DA
IMUNOSSENESCÊNCIA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientadoras: Dra. Ana Maria Caetano de Faria
e Dra. Tatiani Uceli Maioli

Belo Horizonte

2025

043

Coelho, Monique Macedo.

O impacto do meio ambiente nas assinaturas da imunossenescência
[manuscrito] / Monique Macedo Coelho. – 2025.
140 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadoras: Dra. Ana Maria Caetano de Faria e Dra. Tatiani Uceli Maioli.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Meio Ambiente. 3. Envelhecimento. 4.
Imunossenescência. 5. Doenças Endêmicas. I. Faria, Ana Maria Caetano de. II.
Maioli, Tatiani Uceli. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de
Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1




Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MONIQUE MACEDO COELHO. Aos doze dias do mês de agosto de 2025 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O impacto do meio ambiente nas assinaturas da imunossenescência", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Maria Caetano de Faria, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Miriam Chaves Shultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Karen Cecília de Lima Torres (Centro de Pesquisa Rene Rachou, Fiocruz), aprovada; Dr. Gemilson Soares Pontes (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA), aprovada; Dra. Sheila Coelho Soares Lima (Instituto Nacional de Câncer - INCA), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 12 de agosto de 2025.

Documento assinado digitalmente
 MIRIAM CHAVES SCHULTZ
 Data: 13/08/2025 18:22:47-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Miriam Chaves Shultz (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 KAREN CECILIA DE LIMA TORRES
 Data: 13/08/2025 11:50:10-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Dra. Karen Cecília de Lima Torres (Centro de Pesquisa Rene Rachou)


Dr. Gemilson Soares Pontes (Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia)
 GEMILSON SOARES PONTES
 Data: 13/08/2025 08:28:30-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Sheila Coelho Soares Lima (Instituto Nacional de Câncer - INCA)

Dra. Tatiani Uceli Maioli - Coorientadora (UFMG)
 TATIANI UCELI MAIOLI
 Data: 12/08/2025 18:28:00-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Ana Maria Caetano de Faria - Orientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente
 ANA MARIA CAETANO DE FARIA
 Data: 12/08/2025 20:57:10-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 SHEILA COELHO SOARES LIMA
 Data: 13/08/2025 11:08:43-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por confiarem em minhas escolhas e me apoiarem incondicionalmente.

A minha irmã, Thais, pelo suporte diário e carinho.

Ao meu namorado, por seus conselhos sempre cheios de amor.

A minha orientadora, Ana Faria, pelos valiosos ensinamentos e incentivos.

A minha orientadora, Tatiani Maioli, pela disponibilidade e compartilhamento de conhecimento.

Ao professor, Nelson Vaz, por sua inspiração e exemplo.

Aos colegas do LIB, pela colaboração e auxílio constantes.

Aos meus colaboradores, pelo apoio fundamental.

Ilda, Hermes, pela dedicação incansável ao nosso biotério.

Aos funcionários da pós-graduação, pela eficiência e comprometimento.

Às agências financiadoras, pelo suporte financeiro indispensável.

“A boa política deve ter coragem de escutar a ciência, mesmo quando ela é incômoda.”

Ailton Krenak

RESUMO

As mudanças climáticas, impulsionadas por atividades humanas como desmatamento, poluição e consumo insustentável, representam uma ameaça crescente à saúde global, ao intensificarem a exposição a poluentes e agentes infecciosos e favorecerem a ativação crônica do sistema imunológico, processo associado ao envelhecimento imunológico precoce, ou imunossenescência. Esse fenômeno está associado à redução da eficiência imune e ao aumento da vulnerabilidade a infecções, inflamações e doenças crônicas. Embora fatores individuais sejam amplamente reconhecidos, a influência de fatores ambientais coletivos permanece subexplorada, especialmente em países tropicais e de média renda. O objetivo desta tese foi investigar como diferentes exposições ambientais influenciam o ritmo e o perfil da imunossenescência em populações brasileiras. Para isso, foram analisados contextos geográficos contrastantes no Brasil, por meio da integração de análises epigenéticas do envelhecimento biológico, imunofenotipagem celular, dosagem de citocinas e avaliação de indicadores ambientais e de saúde pública. Em área endêmica para doenças infecciosas (Governador Valadares), observou-se envelhecimento epigenético acelerado, acompanhado de aumento na produção de IL-12p70, IL-17A e IL-9. Na comparação entre São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), os residentes de SP apresentaram envelhecimento epigenético acelerado, associado ao aumento de linfócitos B de memória e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com perfis de exaustão e senescência, além de maior produção de citocinas do perfil inflamatório Th2 (IL-4, IL-5, IL-15, CCL3, G-CSF), maior exposição a poluentes atmosféricos e maior número de hospitalizações por doenças respiratórias. Em contraste, em BH predominou um perfil imunológico mais equilibrado, com produção concomitante de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10). Como contribuição original, esta tese demonstra de forma integrada que contextos ambientais contrastantes modulam mecanismos imunológicos e epigenéticos do envelhecimento humano em um país tropical, reforçando a necessidade de políticas públicas voltadas à mitigação dos impactos ambientais adversos e à promoção de estilos de vida mais sustentáveis.

Palavras-chave: meio ambiente; envelhecimento; imunossenescência; infecções endêmicas; poluição

ABSTRACT

Climate change, driven by human activities such as deforestation, pollution, and unsustainable consumption, represents a growing threat to global health by intensifying exposure to pollutants and infectious agents and promoting chronic activation of the immune system, a process associated with premature immune aging, known as immunosenescence. This phenomenon is linked to reduced immune efficiency and increased vulnerability to infections, inflammation, and chronic diseases. Although individual factors are widely recognized, the influence of collective environmental factors remains underexplored, particularly in tropical and middle-income countries. The objective of this thesis was to investigate how different environmental exposures influence the pace and profile of immunosenescence in Brazilian populations. To this end, contrasting geographic contexts in Brazil were analyzed through the integration of epigenetic analyses of biological aging, cellular immunophenotyping, cytokine quantification, and the assessment of environmental and public health indicators. In an area endemic for infectious diseases (Governador Valadares), accelerated epigenetic aging was observed, accompanied by increased production of IL-12p70, IL-17A, and IL-9. In the comparison between São Paulo (SP) and Belo Horizonte (BH), residents of SP exhibited accelerated epigenetic aging associated with increased frequencies of memory B lymphocytes and CD4+ and CD8+ T lymphocytes with exhaustion and senescence profiles, as well as higher production of Th2-associated inflammatory cytokines (IL-4, IL-5, IL-15, CCL3, G-CSF), greater exposure to air pollutants, and a higher number of hospitalizations for respiratory diseases. In contrast, in BH a more balanced immunological profile predominated, characterized by the concurrent production of inflammatory and anti-inflammatory mediators (IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-10). As an original contribution, this thesis demonstrates in an integrated manner that contrasting environmental contexts modulate immunological and epigenetic mechanisms of human aging in a tropical country, reinforcing the need for public policies aimed at mitigating adverse environmental impacts and promoting more sustainable lifestyles.

Keywords: environment; aging; immunosenescence; endemic infections; pollutants

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Impactos das ações antrópicas: consequências ambientais e efeitos na saúde humana.....	17
Figura 2– Fatores ambientais que influenciam o envelhecimento.....	19
Figura 3– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de linfócitos B.....	20
Figura 4– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (CD4+) ou citotóxicos (CD8+)	21
Figura 5– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de células Natural Killer (NK).....	22
Figura 6– O Envelhecimento como um Processo Adaptativo ao Longo da Vida.....	23
Figura 7– Características da senescência celular.....	25
Figura 8– Indivíduos com a Mesma Idade Cronológica Podem Diferir na Idade Biológica....	27
Figura 9– Estratégia de Gating das Células NK.....	36
Figura 10–Estratégia de Gating dos Linfócitos B.....	38
Figura 11–Estratégia de Gating dos Linfócitos T.....	40
Figura 12– Relógios epigenéticos construídos a partir de cálculos da metilação do DNA de indivíduos residentes em área endêmica (EA) e em área não endêmica (NEA).....	44
Figura 13– Perfil global de mediadores séricos de indivíduos que residem em área endêmica (EA) e não endêmica (NEA).....	45
Figura 14– Níveis de mediadores séricos em indivíduos com síndrome gripal (Flu-like) ou da COVID-19 que residem em área endêmica (EA) e não endêmica (NEA).....	47
Figura 15– Padrão global de mediadores séricos em indivíduos infectados que residem em área endêmica (EA) e não endêmica.....	48
Figura 16– Correlações entre os mediadores e a idade biológica em indivíduos que residem em área endêmica (EA) e não endêmica (NEA).....	50
Figura 17– Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam envelhecimento epigenético acelerado em comparação com aqueles que vivem em Belo Horizonte (BH).....	63

Figura 18– Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam diferenças na produção de mediadores inflamatórios em comparação com aqueles que vivem em Belo Horizonte (BH)...	65
Figura 19– Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam diferentes correlações entre os mediadores inflamatórios e a aceleração do envelhecimento epigenético do que os indivíduos que residem em Belo Horizonte (BH).....	66
Figura 20– Diferenças nas frequências de subtipos de células NK em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	69
Figura 21– Diferenças nas correlações entre os subtipos de células NK e envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	70
Figura 22– Diferenças nas frequências dos diferentes subtipos de linfócitos B em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	72
Figura 23– Diferenças nas correlações entre os subtipos de linfócitos B e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	73
Figura 24– Diferenças nas frequências de subtipos de linfócitos T CD4+ em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	76
Figura 25– Diferenças nas correlações de subtipos de linfócitos T CD4+ e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	77
Figura 26– Diferenças nas frequências de subtipos de linfócitos T CD8+ em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	78
Figura 27– Diferenças nas correlações entre os subtipos de linfócitos T CD8+ e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).....	79
Figura 28– Diferenças na emissão de poluentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.....	81
Figura 29– Diferenças nas hospitalizações por doenças do sistema respiratório em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.....	82
Figura 30– Diferenças nas hospitalizações por infecções e doenças parasitárias em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Caracterização da amostra do estudo do capítulo 1	31
Tabela 2– Caracterização da amostra do estudo do capítulo 2	32
Tabela 3– Caracterização dos Diferentes Relógios Epigenéticos Utilizados.....	34
Tabela 4– Painel de Citometria de Fluxo para Avaliação dos Fenótipos de Células NK, Linfócitos B de e Linfócitos T.....	36
Tabela 5– Prevalência de infecções por CMV e Dengue dos indivíduos do grupo controle negativo (NC) residentes em áreas não endêmicas (NEA) e endêmicas (EA), com base em análise sorológica	46
Tabela 6– Comparativo de indicadores demográficos, socioeconômicos e de saúde pública entre BH e SP	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC: Aceleração do envelhecimento

AE: Área endêmica

ANE: Área não endêmica

ANS: Agência Nacional de Saúde Suplementar

ASC: Antibody-secreting cells (Células Secretoras de Anticorpos)

BH: Belo Horizonte

CD: Cluster of Differentiation (Grupamento de Diferenciação)

CDK: Cyclin-Dependent Kinases (Quinases Dependentes de Ciclina).

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa.

CFM: Conselho Federal de Medicina

CM: Central de Memória

CMV: Citomegalovírus

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONEP: Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

COVID-19: Coronavirus disease 2019.

CS: Cytokine Storm (Tempestade de Citocinas).

CT vacinas: Centro de Tecnologia em Vacinas

DataSUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNMTs: DNA Metiltransferases

EEAA: Extrinsic epigenetic age acceleration (Aceleração da idade epigenética extrínseca)

EFF: Efetor

EM: Memória Efetora

ESF: Estratégia Saúde da Família

FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FGF-basic: Fibroblast Growth Factor-Basic (Fator de Crescimento de Fibroblasto-Básico).

G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos).

GIPB: Grupo Integrado de Pesquisas com Biomarcadores.

GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor (Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos/Macrófagos).

GV: Governador Valadares

HIF1: Hipoxia-Inducible Factor 1 (Fator Induzível por Hipóxia 1).

HIV: Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana).

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Índice de Concentração

ICB: Instituto de Ciências Biológicas.

IDH-M: Índice de Desenvolvimento Humano Municipal.

IDSL: Índice de Diferença de Longevidade

IEL: Intraepithelial Lymphocytes (Linfócitos Intraepiteliais).

IFN- γ : Interferon- γ .

IL: Interleucin (Interleucina).

IMC: Índice de Massa Corporal.

IPEA: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno).

MG: Minas Gerais

NAP-1: Neutrophil Activating Protein-1 (Proteína Ativadora de Neutrófilos 1).

NF- κ B: Nuclear Factor Kappa B.

NK: (Células) Natural Killers.

OMSA: Organização Mundial de Saúde Animal

PCR: Proteína C-Reativa.

PD-1: Programmed Death-1 (Morte Programada-1)

PDGF-BB: Platelet Derived Growth Factor-BB (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas-BB).

PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento

RMBH: Região Metropolitana de Belo Horizonte

RT-PCR: Real Time-Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase em Tempo Real).

SAHF: Focos de Heterocromatina Associados à Senescência.

SASP: Senescence-Associated Secretory Phenotype (Fenótipo Secretório Associado a Senescência).

SA- β -gal: β -galactosidase Associada à Senescência.

SCF: Stem Cell Factor (Fator de Célula Tronco).

SP: São Paulo

SRA: Síndrome Respiratória Aguda.

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription (Tradutores de Sinal e Ativadores de Transcrição).

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TETs: enzimas dez-onze translocases

TGF- β : Transformation Growth Factor β (Fator de Crescimento de Transformação β).

Th: T helper (T Auxiliar).

Tfh: T Follicular Helper (Auxiliar Folicular).

TL: Telômero

TLR: Toll-like Receptors (Receptores do tipo Toll)

TNF- α : Tumoral Necrose Factor α (Fator de Necrose Tumoral α).

TR: Trato Respiratório.

TREG: (Células) T Reguladoras.

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial)

WHO: World Health Organization (OMS- Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	17
2.MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Declaração de ética	29
2.2 Seleção e classificação dos voluntários	29
2.3 Medição de mediadores inflamatórios pelo Ensaio de Luminex-Multiplex.....	32
2.4 Análise por gráficos de radar	32
2.5 Extração do DNA.....	33
2.6 Identificação das ilhas CpG Metiladas	33
2.7 Estimativa da Idade Epigenética (DNAmAge).....	33
2.8 Sorologia.....	35
2.9 Análise de correlação de Spearman	35
2.10 Imunofonotipagem por citometria de fluxo	35
2.12 Análises com base em bancos de dados públicos	40
2.13 Análise estatística.....	40
3.CAPÍTULO 1	42
3.1 Viver em Área Endêmica de Doenças Infecciosas Está Associado a Diferenças nas Assinaturas de Imunossenescência	42
4.RESULTADOS CAPÍTULO 1	43
4.1 Indivíduos Residentes em Área Endêmica Apresentam Envelhecimento Epigenético Acelerado	43
4.2 Indivíduos Residentes em Área Endêmica para Doenças Infecciosas Apresentam Maior Produção de IL-12p70, IL-17A e IL-9	46
4.3 Indivíduos de Área Endêmica com Sintomas Semelhantes à Gripe ou COVID-19 Apresentam Maior Produção de Mediadores Plasmáticos	47
4.4 Perfil de Altos Produtores de Indivíduos Infectados: Área Endêmica vs. Área Não Endêmica.....	47

4.5 Indivíduos de Área Endêmica Apresentam Correlações Distintas entre Mediadores Inflamatórios e Idade Epigenética.....	49
5.DISSCUSSÃO CAPÍTULO 1	52
6.CAPÍTULO 2	59
6.1 Viver em Diferentes Contextos Urbanos Pode Influenciar o Ritmo e o Perfil da Imunossenescência.....	59
7.RESULTADOS CAPÍTULO 2.....	60
7.1 Análise Comparativa de Indicadores Populacionais e de Saúde Pública em BH e SP..	60
7.2 Indivíduos Residentes em São Paulo Apresentam Envelhecimento Epigenético Acelerado em Relação à Indivíduos Residentes em Belo Horizonte.....	62
7.3 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Produção dos Mediadores Inflamatórios	63
7.4 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência de Subtipos de Células NK	67
7.5 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência em Diferentes Subtipos de Linfócitos B	71
7.6 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência em Diferentes Subtipos de Linfócitos T.....	74
7.7 São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Emissão de Poluentes.....	80
7.8 Diferenças nas Hospitalizações por Doenças do Sistema Respiratório, Infecções e Doenças Parasitárias entre Residentes de São Paulo e Belo Horizonte.....	81
8.DISSCUSSÃO CAPÍTULO 2	84
9.CONCLUSÃO.....	104
10.REFERÊNCIAS	106
Anexo 1: Script usado no pacote WateRmelon.....	125
Anexo 2: Script usado para análise com o pacote Methylock.....	126
Anexo 3: Artigo correspondente ao Capítulo 2.....	128

1. INTRODUÇÃO:

A pesquisa em saúde humana tem se deparado com questões cada vez mais complexas, decorrentes de mudanças globais, como o crescimento populacional, a rápida urbanização, a invasão de ecossistemas, o tráfego globalizado, a poluição e o consumo insustentável. Esses fatores afetam diretamente as mudanças climáticas, contribuindo para o derretimento das calotas polares, a elevação do nível dos oceanos, alterações na dinâmica ecológica de vetores, extinção de espécies e outras consequências que levam ao desequilíbrio ambiental (Zinsstag et al., 2011).

No entanto, tais transformações não resultam apenas em perturbações ambientais, conforme evidenciado durante a pandemia de COVID-19, em 2020 (Barouki et al., 2021). Elas também impactam diretamente a saúde humana, levando, por exemplo, ao surgimento de novas doenças infecciosas (Zinsstag et al., 2011). A figura 1, apresentada a seguir, ilustra a relação entre as ações antrópicas, suas consequências ambientais e os efeitos sobre a saúde humana.

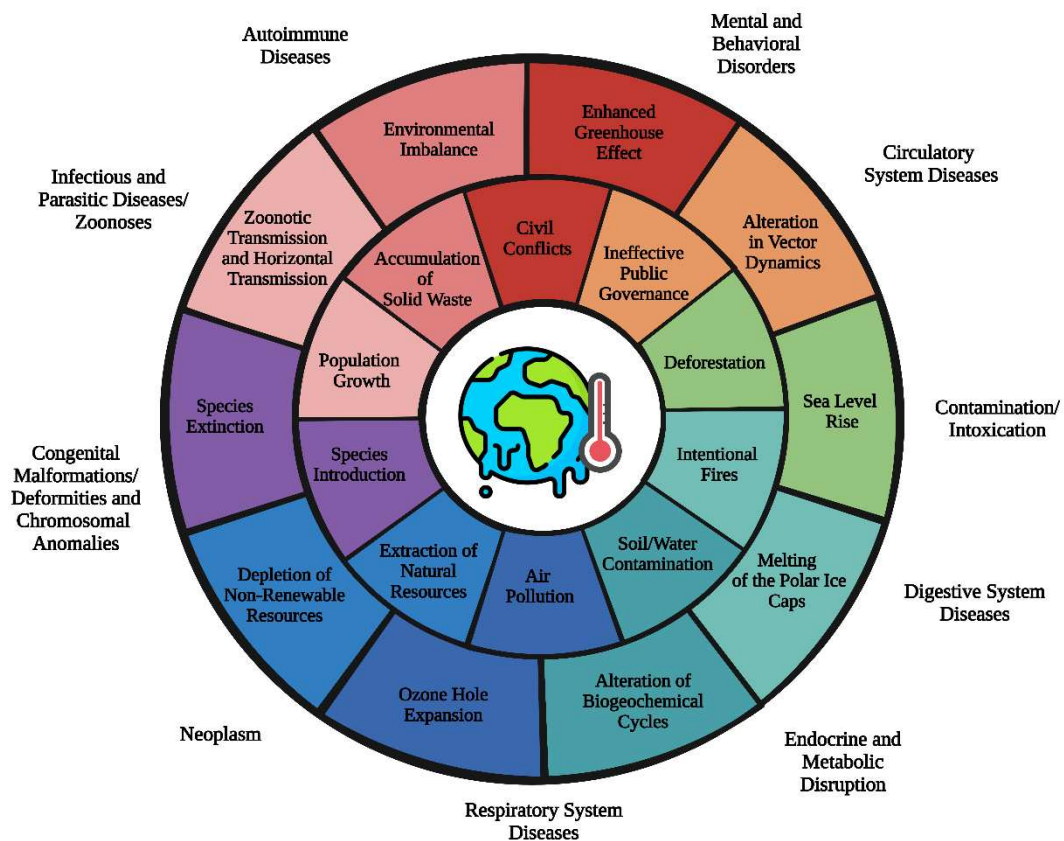


Figura 1– Impactos das ações antrópicas: consequências ambientais e efeitos na saúde humana. O círculo mais interno representa as ações antrópicas que contribuem para o aumento da temperatura global (indicado no centro da figura): em vermelho, os conflitos civis; em laranja, a ineficiência de políticas públicas; em verde, o desmatamento; em verde-água, as queimadas intencionais; em azul-claro, a contaminação do solo e da água; em azul-escuro, a poluição do ar; em azul-royal, a extração de recursos naturais; em roxo, a introdução de espécies; em rosa-claro, o crescimento populacional; e, em rosa-escuro, o acúmulo de resíduos sólidos. O círculo externo representa as consequências ambientais: em vermelho, o aumento do efeito estufa; em laranja, a alteração na dinâmica de vetores; em verde, a elevação do nível dos oceanos; em verde, o derretimento das calotas polares; em azul-claro, as alterações nos ciclos biogeoquímicos; em azul-escuro, o aumento do buraco na camada de ozônio; em azul-royal, o esgotamento dos recursos não renováveis; em roxo, a extinção de espécies; em rosa-claro, as transmissões zoonóticas e horizontais; e, em rosa-escuro, o desequilíbrio ambiental. Ao redor da figura estão dispostos os impactos dessas ações antrópicas na saúde humana: desordens mentais e comportamentais, doenças do sistema circulatório, contaminações e intoxicações, doenças do sistema digestivo, disfunções endócrinas e metabólicas, doenças do sistema respiratório, neoplasias, malformações congênitas, deformidades e anomalias cromossômicas, infecções parasitárias e zoonoses, além de doenças autoimunes (Coelho, 2025).

Diante desse cenário de mudanças rápidas e complexas, torna-se evidente a interconexão entre seres humanos, animais e meio ambiente, o que exige abordagens integradas. A Saúde Única, também conhecida como *One Health*, é uma abordagem integrada que reconhece essa interdependência (Zhang et al., 2025) e foi proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em colaboração com a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO).

É sob essa perspectiva que examinaremos a questão do envelhecimento das populações do Sudeste brasileiro. O envelhecimento populacional impõe pressão aos sistemas de saúde, que precisam ser sustentáveis e integrados, uma vez que a demanda por serviços cresce de forma exponencial. Além disso, as desigualdades no envelhecimento saudável refletem as desigualdades ambientais, visto que o acesso a ambientes saudáveis, ar limpo, água potável e alimentos seguros não é igual para todos (Yusipov et al., 2024).

Desse modo, o envelhecimento saudável passa a depender também de políticas ambientais e urbanas bem estruturadas, uma vez que pode ser acelerado por fatores intrínsecos e extrínsecos, como estilos de vida inadequados e a exposição a estressores ambientais. Assim, indivíduos

expostos a condições ambientais menos favoráveis tendem a envelhecer biologicamente mais rapidamente (Yusipov et al., 2024). Os fatores ambientais que influenciam o envelhecimento estão ilustrados na figura 2, apresentada a seguir.

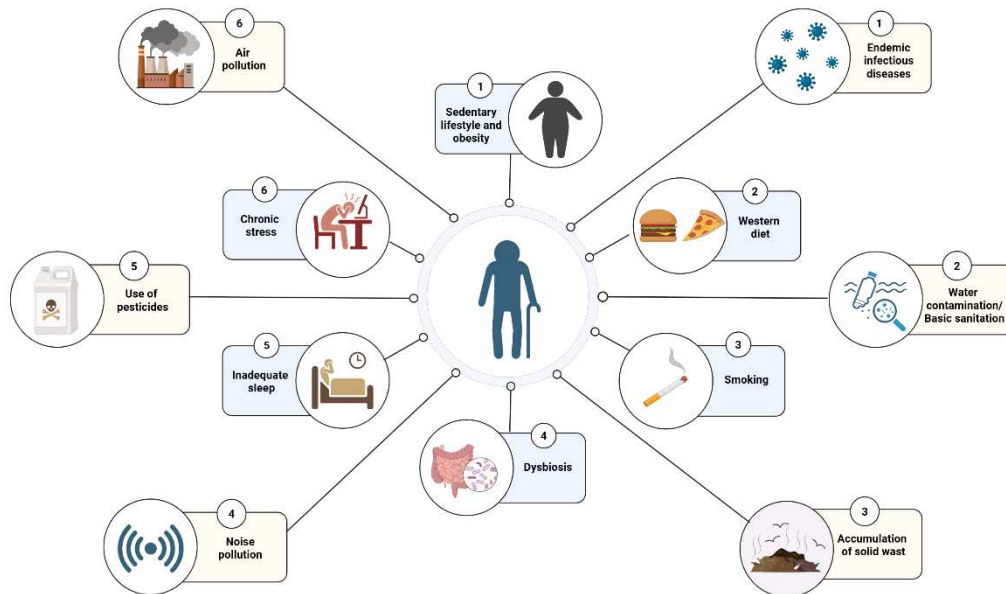


Figura 2– Fatores ambientais que influenciam o envelhecimento. Em azul, mais próximo ao centro da figura, estão representados os fatores ambientais individuais que contribuem para o envelhecimento: (1) estilo de vida sedentário e obesidade, (2) dieta ocidentalizada, (3) tabagismo, (4) disbiose, (5) sono inadequado e (6) estresse crônico. Em amarelo, posicionados externamente ao centro da figura, estão os fatores ambientais coletivos que também contribuem para a imunossenescência: (1) doenças e infecções crônicas, (2) contaminação da água e condições de saneamento básico, (3) acúmulo de resíduos sólidos, (4) poluição sonora, (5) uso de pesticidas e (6) poluição do ar (Coelho, 2025).

Enquanto alguns indivíduos apresentam fragilidade e necessitam de assistência nas atividades diárias por volta dos 70 anos, outros permanecem independentes e parecem escapar de uma deterioração fisiológica mesmo em idades extremamente avançadas. Entretanto, considerando o aumento da longevidade global e a consequente expansão da população idosa, torna-se

evidente a necessidade de uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos biológicos do envelhecimento e dos determinantes do envelhecimento saudável. Como já mencionado, o envelhecimento é um fenômeno biológico multifatorial e heterogêneo, que afeta os indivíduos de maneiras distintas (Cohen et al., 2020).

As alterações imunológicas desse processo, conhecidas coletivamente como imunossenescência, estão associadas ao aumento da suscetibilidade a infecções devido ao declínio de algumas funções imunológicas (Hanlon et al., 2018; Kennedy et al., 2014). Esse fenômeno é caracterizado por diversas alterações associadas aos linfócitos B, como a diminuição da diferenciação dessas células na medula óssea, acompanhada da redução da frequência de linfócitos B virgens; o aumento proporcional da frequência de células B de memória na periferia; e a consequente diminuição do repertório global dessas células (Miller & Cancro, 2007). Além disso, na tentativa de compensar essas alterações, Holodick e Rothstein sugerem que as células B-1, responsáveis principalmente pela produção de imunoglobulinas naturais, em especial IgM, possam desempenhar um papel protetor essencial em doenças associadas ao envelhecimento (Holodick & Rothstein, 2015). Esses aspectos estão ilustrados na figura 3, apresentada a seguir, na qual são representadas as principais características dos receptores de diferentes subpopulações de linfócitos B comumente associadas à imunossenescência.

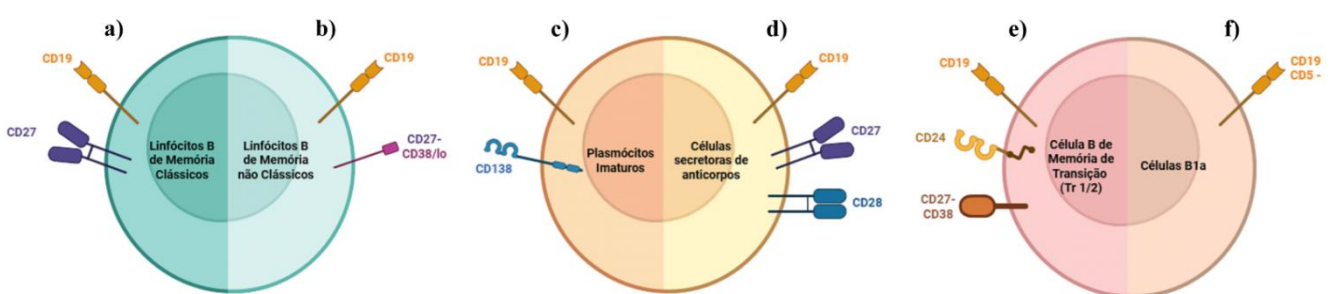


Figura 3– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de linfócitos B. (a) Linfócitos B de memória clássicos (CD19+, CD27+ CD38-); (b) linfócitos B de memória não clássicos (CD19+, CD27-, CD24+ CD38-/lo); (c) plasmócitos imaturos (CD19+, CD138+); (d) células secretoras de anticorpos (*antibody-secreting cells* – ASC)

(CD19+, CD27+, CD38hi); (e) linfócitos B de memória transitórios T1/T2 (CD19+, CD27-, CD24+ CD38hi); e dos (f) linfócitos B-1a (CD19+, CD5-) (Coelho, 2025).

A imunossenescência também envolve a involução do timo, que leva à menor produção de linfócitos T virgens, ao aumento proporcional da frequência de células T de memória, à redução da diversidade do repertório global de células T e ao acúmulo de linfócitos com perfil de senescência e exaustão na periferia (Ajoalabady et al., 2024). Os linfócitos T senescentes são células que sofreram uma interrupção permanente do ciclo celular, cessando sua proliferação; acumulam danos moleculares, apresentam metabolismo desregulado e produzem mediadores associados à senescência. Além disso, expressam receptores como CD57 e TIGIT e perdem a expressão de moléculas coestimuladoras essenciais, como CD28 e CD27 (Di Micco et al., 2021). Por outro lado, os linfócitos T exaustos apresentam um fenótipo potencialmente reversível e são caracterizados pela expressão de correceptores inibitórios, como PD-1, LAG-3 e TIM-3, além de possuírem reduzida capacidade proliferativa e menor produção de citocinas (Wherry, 2011). Esses aspectos estão ilustrados na figura 4, apresentada a seguir, na qual são representadas as principais características dos receptores de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ presentes na imunossenescência.

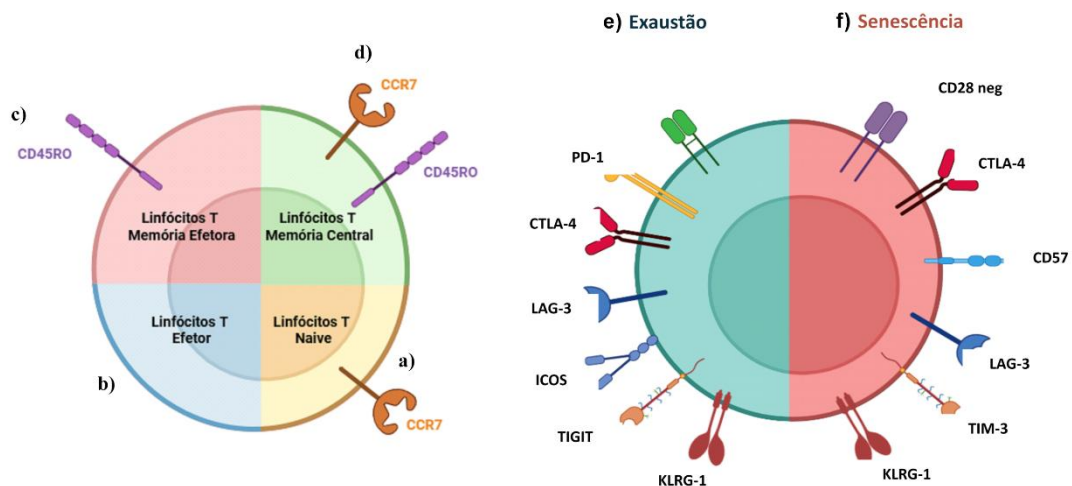


Figura 4– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) ou citotóxicos (CD8⁺). (a) Linfócitos naïve (CD45RO⁻/CCR7⁺); (b) linfócitos efetores (EFF) (CD45RO⁻/CCR7⁻), (c) linfócitos de memória efetora (EM) (CD45RO⁺/CCR7⁻); e (d) linfócitos de memória central (CM)

(CD45RO⁺/CCR7⁺). Dentre essas subpopulações, foram considerados como células com perfil (e) exausto aquelas que expressavam PD-1; e/ou; CTLA4, LAG3, ICOS; TIGIT; KLG1 e (f) senescentes aquelas que apresentavam perda da expressão de CD28; e/ou expressão de CLTA-4; CD57; LAG3; TIM3 e/ou KLRG1 (Coelho, 2025).

As células “natural killer” (NK) também apresentam alterações importantes associadas ao envelhecimento. Essas mudanças incluem a redução na secreção de citocinas e a diminuição da atividade citotóxica, mesmo com o aumento no número dessas células observado com o avanço da idade. Apesar dessas alterações, as células NK desempenham um papel fundamental na imunovigilância de células senescentes, embora também possam apresentar um fenótipo senescente e exausto (Brauning et al., 2022). Esses aspectos estão ilustrados na figura 5.

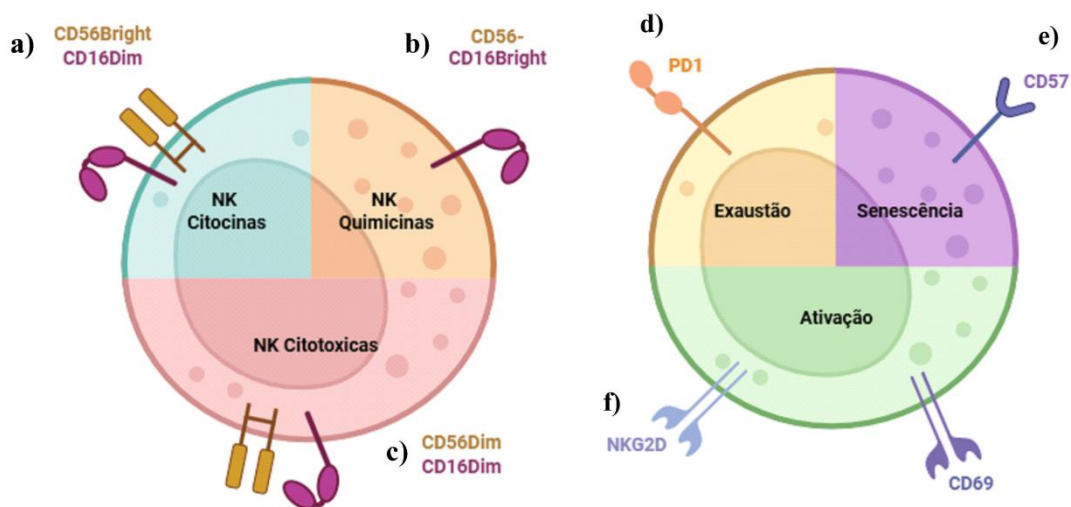


Figura 5– Representação dos principais receptores de diferentes subpopulações de células Natural Killer (NK). (a) NKs produtoras de citocinas (CD3⁻ e CD56^{Bright}); (b) NKs produtoras de quimiocinas (CD3⁻, CD56⁻, CD16^{Bright}); e (c) NKs citotóxicas (CD3⁻ e CD56^{Dim}), com perfis de (d) exaustão (PD1⁺), (e) senescência (CD57⁺) e/ou (f) ativação (NKG2D⁺ ou CD69⁺) (Coelho, 2025).

A imunossenescência também é caracterizada por um estado crônico de inflamação de baixo grau, denominado *inflammaging*, identificado por alterações nos níveis de mediadores

plasmáticos, como IL-6, TNF- α , IL-1 e IL-10 (Franceschi et al., 2007; Fulop et al., 2018). Essa inflamação é uma consequência sistêmica de diversos eventos associados ao envelhecimento, incluindo modificações epigenéticas, disfunção mitocondrial, instabilidade genômica, mudanças na microbiota intestinal e o acúmulo de células senescentes (Ajoalabady et al., 2024), como representado na figura 6.

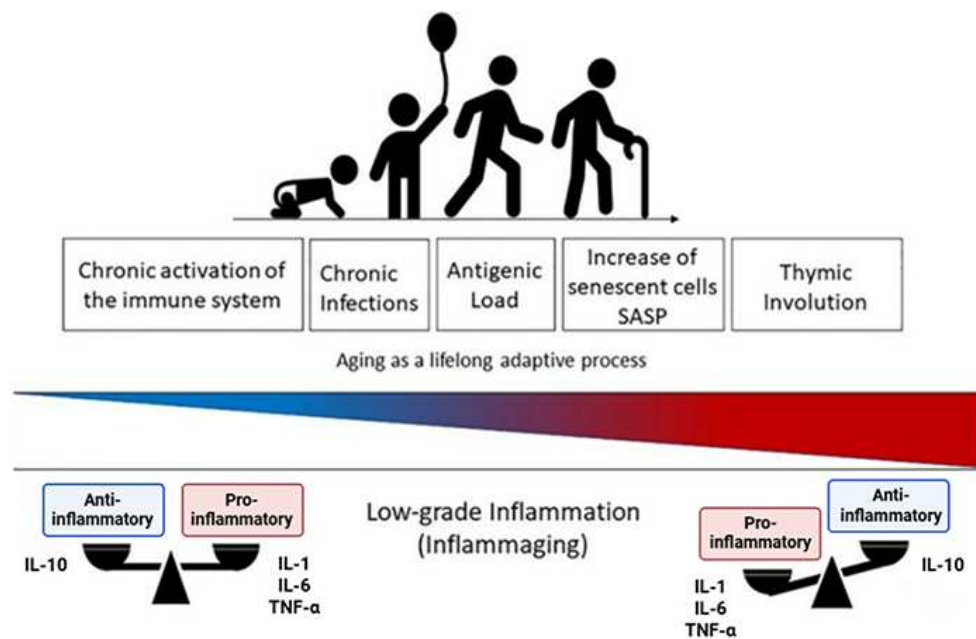


Figura 6– O Envelhecimento como um Processo Adaptativo ao Longo da Vida. A ativação crônica do sistema imunológico, as infecções crônicas, a exposição a cargas antigênicas, o aumento de células senescentes (fenótipo SASP) e a involução tímica pode alterar o perfil equilibrado de mediadores anti-inflamatórios (IL-10) versus pró-inflamatórios (IL-1, IL6, TNF- α) (Adaptado de Batista et al., 2020).

Apesar disso, um estudo recente que avaliou especificamente os efeitos da industrialização sobre o perfil inflamatório demonstrou que as citocinas associadas ao envelhecimento em indivíduos residentes em regiões industrializadas são semelhantes àquelas comumente observadas em estudos europeus. Ressalta-se, entretanto, que, embora os estudos europeus tenham sido majoritariamente conduzidos em coortes provenientes de contextos industrializados, a industrialização em si não foi considerada um desfecho nem uma variável analítica explícita nas investigações até então realizadas. Entretanto, duas coortes de populações

indígenas não industrializadas apresentaram resultados distintos, com pouca ou nenhuma associação com as citocinas classicamente associadas à idade. Esses achados sugerem que o envelhecimento inflamatório parece ser, ao menos em parte, influenciado por estilos de vida industrializados, apresentando grande variação entre ambientes e populações (Franck et al., 2025).

Além disso, as células senescentes apresentam diversas alterações morfológicas e funcionais. A senescência celular pode afetar todas as células do organismo, em diferentes graus e momentos, levando à aquisição de um fenótipo senescente. De modo geral, essas células são maiores do que aquelas em proliferação, apresentam núcleos de formato irregular, perda da proteína da lâmina nuclear B1 e acúmulo de focos de heterocromatina associados à senescência (SAHF) (Wang et al., 2024).

O acúmulo de SAHF é consequência de danos persistentes ao DNA dessas células, o que leva à fosforilação de genes supressores de tumores como p53, responsável pela ativação de p21 e p16. A ativação dos inibidores das cinases dependentes de ciclina (CDK) p21 e p16, CDK4 e CDK6, induzem a hipofosforilação das proteínas Rb, p107 e p130. Essa modificação inibe os fatores de transcrição E2F e seus genes-alvo, como as ciclinas do tipo E, interrompendo o ciclo celular na fase G1 (Wang et al., 2024).

A ativação do programa de senescência celular, com a inibição da proliferação após a identificação de danos ao DNA, constitui um mecanismo importante de proteção contra a transformação cancerígena, uma vez que parte desses danos poderia resultar em proliferação descontrolada e formação de tumores (Marin et al., 2023). Assim, a senescência celular deve ser considerada também sob essa perspectiva ao se discutir estratégias para o controle ou a reversão desse processo.

Do ponto de vista estrutural e funcional, organelas como lisossomos, retículo endoplasmático e mitocôndrias mostram-se disfuncionais nesse estado celular. A atividade aumentada da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) e a resistência à apoptose, decorrente do aumento da expressão de proteínas da família Bcl-2, são consideradas marcadores clássicos de senescência. Além disso, a presença dos macroporos mitocondriais BAX e BAK é essencial para a liberação de DNA mitocondrial, um processo relacionado à permeabilização da membrana externa da mitocôndria (Wang et al., 2024).

Por fim, uma das principais características funcionais das células senescentes é a secreção elevada de diversas moléculas inflamatórias, denominadas coletivamente como fenótipo

secretor associado à senescência (SASP) (Wang et al., 2024). A figura 7, apresentada a seguir, ilustra as principais características da senescência celular. O SASP é caracterizado pela secreção de citocinas, quimiocinas, proteases e fatores de crescimento, que exercem influência sobre o microambiente tecidual por meio de vias autócrinas e parácrinas. Esses mediadores contribuem para o estabelecimento e a manutenção do *inflammaging* (Borodkina et al., 2018).

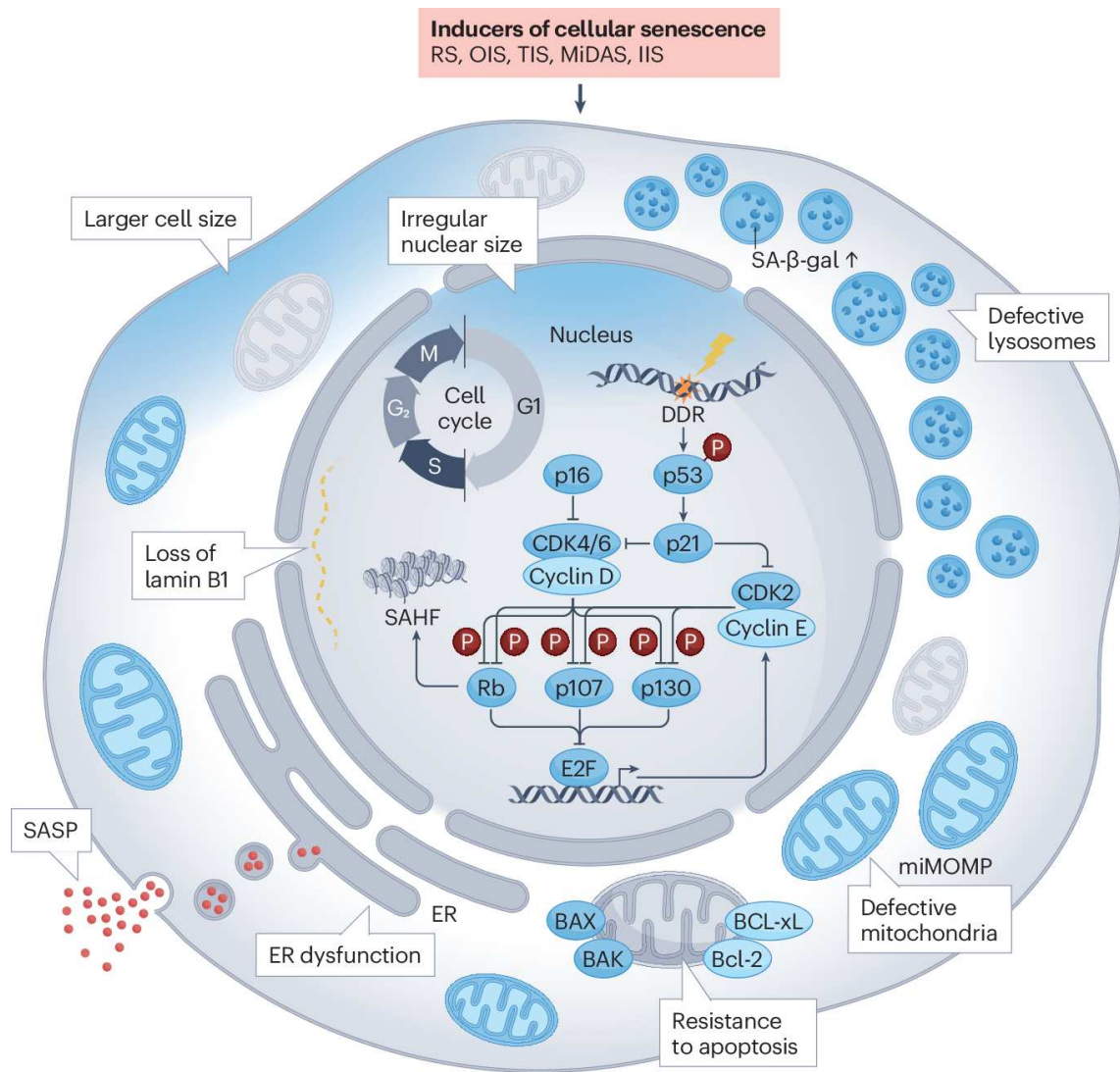


Figura 7– Características da senescência celular. As células senescentes sofrem alterações morfológicas e são classificadas conforme seus indutores: senescência replicativa (RS), induzida por oncogenes (OIS), por terapias (TIS), por disfunção mitocondrial (MiDAS) e imunologicamente induzida (IIS). A superexpressão dos inibidores de CDK p21 e p16 é comum e, ao inibir CDK4/CDK6, reprime fatores de transcrição E2F, bloqueando o ciclo celular na fase G1. Essas células apresentam tamanho aumentado, alterações nucleares (perda de lamin B1, acúmulo de SAHF), organelas defeituosas (lisossomos, RE e mitocôndrias), aumento da

atividade de SA- β -gal, resistência à apoptose (Bcl-2) e liberação de DNA mitocondrial mediada por macroporos BAX/BAK. Além disso, caracterizam-se pela secreção aumentada de fatores inflamatórios, coletivamente denominados SASP (Wang et al., 2024).

No entanto, nem todos os idosos desenvolvem doenças inflamatórias crônicas ou manifestam fragilidade decorrente do *inflammaging*. Estudos com nonagenários e centenários saudáveis na Itália, bem como com idosos saudáveis no Brasil, demonstraram que esses indivíduos desenvolvem mecanismos de remodelamento capazes de compensar os efeitos deletérios do *inflammaging* e da imunossenescência (Caetano Faria et al., 2008; Caruso et al., 2022; Lima-Silva et al., 2024; Santoro et al., 2021).

Portanto, o envelhecimento não resulta em um declínio linear e universal da função imunológica. Alguns indivíduos desenvolvem mecanismos de remodelamento imunológico que lhes permitem atenuar os efeitos deletérios da imunossenescência (Speziali et al., 2004). Estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que idosos não infectados, residentes em áreas endêmicas para esquistossomose, desenvolvem mecanismos de proteção imunológica inata que compensam o declínio da função das células T associado à idade (Comin et al., 2007; Speziali et al., 2004).

Um desses estudos revelou que a frequência de células NK produtoras de IFN- γ aumenta com o envelhecimento e se mantém elevada em indivíduos com mais de 70 anos (Speziali et al., 2004). Em outro estudo, observamos um aumento na frequência de células NK expressando receptores Toll-like, além de células dendríticas e monócitos expressando diferentes TLRs (Comin et al., 2007). Esses achados sugerem que a compensação da resposta imune inata pode desempenhar um papel relevante na resistência à infecção e no envelhecimento saudável em indivíduos residentes em áreas endêmicas.

No entanto, também relatamos que a intensificação das respostas imunológicas inatas, desencadeada por estímulos antigênicos contínuos em indivíduos dessas regiões, pode estar associada ao envelhecimento biológico acelerado, conforme evidenciado pela metilação das ilhas CpG no DNA (Durso et al., 2022). A metilação do DNA é um dos principais mecanismos de regulação da expressão gênica e é reconhecida como um biomarcador altamente preciso do envelhecimento celular. Com base nesse mecanismo, foram desenvolvidos relógios epigenéticos capazes de estimar a idade biológica dos indivíduos, detectando tanto a aceleração quanto a desaceleração do envelhecimento (Field et al., 2018). Dessa forma, indivíduos com a

mesma idade cronológica podem apresentar idades biológicas distintas, como ilustrado na figura 8.

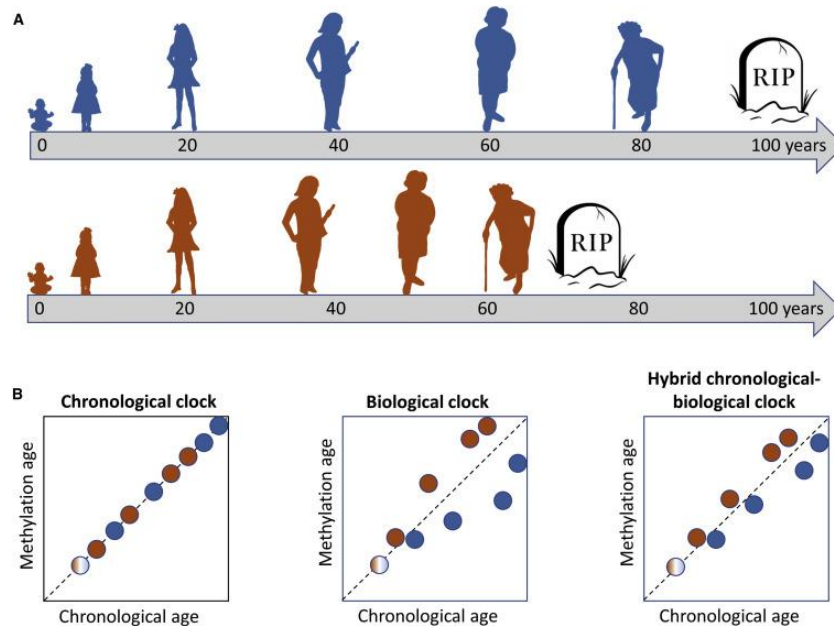


Figura 8– Indivíduos com a Mesma Idade Cronológica Podem Diferir na Idade Biológica.

(a) Desenho esquemático mostrando que pessoas com a mesma idade cronológica podem ter diferentes idades biológicas e consequente diferentes riscos associados a mortalidade, o vermelho envelhece biologicamente mais rapidamente do que o azul. (b) Ilustração de três relógios de metilação, à direita um relógio perfeito, onde não é possível distinguir entre indivíduos que envelhecem biologicamente rápido (vermelho) ou lento (azul). Outro relógio biológico (no meio) pode distinguir entre envelhecimento não saudável (vermelho) versus envelhecimento saudável (azul) e o relógio híbrido (à direita), menos preciso, onde a idade biológica acompanha de perto a idade cronológica (Field et al., 2018).

Além disso, os padrões de metilação do DNA estão associados a diversas doenças relacionadas à idade, incluindo Alzheimer (Pellegrini et al., 2021), doenças cardiovasculares (Fernández-Sanlés et al., 2021) e câncer (Fernandes Durso et al., 2017). Evidências indicam que a metilação do DNA pode ser modulada por estímulos ambientais, como exercícios físicos (Turner et al., 2020), dieta (Pauwels et al., 2017), tabagismo (Joubert et al., 2016) e exposição a poluentes (Plusquin et al., 2017). Assim, fatores associados ao estilo de vida, incluindo hábitos alimentares, atividade física, bem-estar, estresse, tabagismo e qualidade do sono, exercem influência significativa sobre o envelhecimento (Bloomberg et al., 2024; Friedman, 2020).

As variações nas exposições antigênicas ao longo da vida também resultam em alterações no perfil imunológico durante o envelhecimento, processo conhecido como imunobiografia (Franceschi et al., 2017). Diferenças na combinação dos antígenos, quanto ao tipo, à dose, à frequência e à sequência temporal de exposição, constituem elementos fundamentais desse processo. Em outras palavras, o sistema imunológico reflete o acúmulo das experiências imunológicas ao longo da vida (Franceschi et al., 2017).

Embora diversos fatores individuais relacionados ao estilo de vida influenciem diretamente essas exposições, os indivíduos também estão sujeitos a fatores ambientais coletivos, como a poluição do ar, a contaminação da água e dos alimentos e a exposição a doenças infecciosas, cuja prevenção e controle dependem de decisões associadas às políticas públicas.

Tradicionalmente, os estudos sobre envelhecimento têm sido conduzidos majoritariamente em coortes de países desenvolvidos, com foco em populações predominantemente caucasianas. No entanto, considerando que o ritmo e o perfil do envelhecimento não são universais nem lineares, a hipótese central desta tese é que, além do estilo de vida, fatores ambientais coletivos, como a exposição crônica a agentes infecciosos e à poluição ambiental, estejam associados a padrões distintos de imunossenescência.

Considerando que diferenças geográficas na exposição a antígenos podem estar associadas a distintos padrões de imunossenescência, esta tese compara três cidades e apresenta seus resultados em dois capítulos. No primeiro capítulo, analisamos o envelhecimento biológico de voluntários residentes em uma área endêmica (AE), Governador Valadares, caracterizada por alta prevalência de esquistossomose, leishmaniose, hanseníase e infecções virais, em comparação com uma área não endêmica (ANE), Belo Horizonte.

No segundo capítulo, investigamos o envelhecimento biológico de voluntários residentes em duas capitais brasileiras com características sociais, econômicas e urbanas distintas: São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH). São Paulo destaca-se como o principal centro financeiro da América Latina, com elevada densidade populacional e intensa atividade econômica. Em contraste, Belo Horizonte apresenta menor densidade populacional e um planejamento urbano que integra áreas verdes ao espaço construído. Essas diferenças, aliadas a aspectos culturais e de organização social, refletem-se em distintos contextos de qualidade de vida e interação social, potencialmente relevantes para o processo de envelhecimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Declaração de ética

Este estudo seguiu rigorosamente as diretrizes éticas estabelecidas pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), assegurando a proteção, segurança e bem-estar de todos os participantes. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais (CEP-UFMG) e pelo CONEP, sob o número de Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 40208320.3.1001.5149. Todos os voluntários foram devidamente informados sobre os objetivos e procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de sua participação.

2.2 Seleção e classificação dos voluntários

O estudo foi realizado em três cidades brasileiras com perfis distintos. No primeiro capítulo, comparamos coortes de indivíduos com diferentes perfis epidemiológicos. Uma das coortes incluiu 107 participantes residentes em Belo Horizonte (MG), uma área não endêmica para doenças infecciosas, enquanto a outra foi composta pelo mesmo número de voluntários provenientes de Governador Valadares (MG), uma região endêmica. Dessa forma, a amostra analisada no primeiro capítulo totalizou 214 indivíduos, cujas características estão apresentadas na Tabela 1.

No segundo capítulo, foram comparadas coortes de indivíduos residentes em duas capitais brasileiras com características socioeconômicas e urbanísticas distintas. A análise incluiu 16 participantes recrutados em Belo Horizonte (MG) e outros 16 em São Paulo (SP), totalizando uma amostra de 32 indivíduos, cujas informações estão apresentadas na Tabela 2. Em ambos os capítulos, os voluntários foram rigorosamente pareados quanto ao sexo, idade e presença de comorbidades.

O recrutamento dos voluntários ocorreu entre dezembro de 2020 e outubro de 2021. No primeiro capítulo, os indivíduos foram identificados e classificados em três grupos: aqueles que apresentavam sintomas compatíveis com síndromes gripais de origem desconhecida e testaram negativo para COVID-19; aqueles com infecção confirmada por COVID-19; e aqueles assintomáticos que testaram negativo para COVID-19, compondo o grupo controle. Durante o período de coleta, as variantes circulantes do SARS-CoV-2 incluíam tanto a cepa original

quanto a variante P.1. Já no segundo capítulo, a coorte foi composta exclusivamente por indivíduos assintomáticos que testaram negativo para COVID-19. Todos os participantes selecionados foram submetidos ao teste de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) para a confirmação da infecção por SARS-CoV-2.

Os voluntários foram recrutados em diferentes unidades de saúde, incluindo a Unidade de Pronto Atendimento Centro-Sul (UPA-Centro Sul) e o Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves, ambos localizados em Belo Horizonte; o Hospital Unimed, em Governador Valadares; e o Instituto de Infectologia do Hospital Emílio Ribas, em São Paulo.

Os critérios de inclusão abrangeram indivíduos adultos ou idosos, com idade igual ou superior a 20 anos, independentemente da presença de sintomas gripais, desde que concordassem em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram estabelecidos critérios de exclusão rigorosos, removendo do estudo crianças e adolescentes (menores de 18 anos), indivíduos com resultados inconclusivos no teste RT-PCR para detecção da COVID-19, aqueles com sintomas gripais persistentes por mais de nove dias e indivíduos vivendo com HIV.

Os participantes tiveram seu índice de massa corporal (IMC) classificado conforme os seguintes critérios: abaixo do peso ($IMC < 18,5$), peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9), sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9) e obesidade ($IMC \geq 30,0$).

A equipe do estudo foi responsável pelo recrutamento dos voluntários nas unidades de saúde, esclarecendo eventuais dúvidas sobre o TCLE. Os participantes foram submetidos a uma entrevista clínica e sociodemográfica, seguida da coleta de amostras sanguíneas para separação de soro e plasma, além da coleta de swab nasofaríngeo para a detecção do SARS-CoV-2 por meio de RT-PCR. Os indivíduos com diagnóstico confirmado de COVID-19 foram telemonitorados por um período de 14 dias após a entrega dos resultados do teste RT-PCR.

Os exames de RT-PCR para diagnóstico da COVID-19 foram realizados no Centro de Tecnologia de Vacinas (CT Vacinas) da UFMG, em colaboração com a professora Santuza Teixeira e seu orientando Hugo Satori. Após a identificação dos indivíduos positivos para o SARS-CoV-2, os voluntários foram classificados conforme a recomendação da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020), utilizando um escore clínico. Os voluntários com RT-PCR positivo que se recuperaram sem necessidade de hospitalização foram classificados como casos de desfecho “leve” de COVID-19 (escores 1, 2 e 3). Aqueles que necessitaram de suporte médico não invasivo, sem agravamento do quadro clínico e com administração moderada de oxigenoterapia, foram classificados como casos de desfecho “moderado” (escores 4 e 5). Por

fim, os voluntários que necessitaram de hospitalização e evoluíram para quadros mais graves, com necessidade de procedimentos médicos invasivos e maiores volumes de oxigenoterapia, foram classificados como casos de desfecho “grave” (escores de 6 a 9). É importante destacar que os voluntários definidos como saudáveis foram aqueles que não apresentaram infecção prévia por SARS-CoV-2. Para as análises descritas no Capítulo 1 desta tese, foram utilizados apenas os indivíduos com desfecho “leve” de COVID-19, a fim de viabilizar o pareamento entre os grupos experimentais. Já os voluntários com resultado negativo no teste de RT-PCR para COVID-19, mas que apresentavam sintomas gripais, foram incluídos no estudo como indivíduos com síndrome gripal (Flu-like).

Tabela 1. Caracterização da amostra do estudo do capítulo 1

	AE (Área Endêmica)			ANE (Área Não Endêmica)		
	Síndrome Gripal (n = 45)	COVID-19 (n = 47)	Controle Negativo (n = 15)	Síndrome Gripal (n = 45)	COVID-19 n = 47	Controle Negativo (n = 15)
Idade (anos)	38 (18-60)	38,5 (18-77)	41 (19-78)	36 (19-63)	40,5 (18-76)	39 (18-65)
Sexo Feminino (%)	51,1	46,8	46,7	46,6	53,19	53,3
Sexo Masculino (%)	48,9	54,2	53,3	53,4	46,80	46,6
IMC (Kg/m ²)	28,3 ±5,57	26,29 ±4,53	26 ±4,21	28,4 ±7	30 ±5,67	27 ±6,82
Carga Viral (ct)	–	21,89 ±7,12	–	–	27,3 ±5,14	–
Comorbidades (%)	28,8	23,4	20	24,4	23,4	26,6
Hipertensão (n)	9	6	2	6	6	3
Diabetes Mellitus (n)	3	3	0	4	3	1
Doenças Respiratórias (n)	0	2	1	1	0	0
Outras (n)	1	0	0	0	2	0

ANE- área não endêmica; AE- área endêmica; NC- controle negativo; FS- síndrome gripal; IMC – Índice de massa corporal, calculado pela fórmula kg/m², em que kg representa o peso da pessoa em quilogramas e m² corresponde à sua altura em metros quadrados.

Tabela 2. Caracterização da amostra do estudo do capítulo 2

	BH (n=16)	SP (n=16)
Idade (anos)	38 (18-60)	36 (19-63)
Sexo Feminino (%)	51,1	46,6
Sexo Masculino (%)	48,9	53,4
IMC (Kg/m ²)	28,3 ±5,57	28,4 ±7
Comorbidades (%)	25	18,75
Hipertensão (n)	2	1
Diabetes Miellitus (n)	1	0
Doenças Respiratórias (n)	0	1
Outras (n)	1	1

IMC – Índice de massa corporal, calculado pela fórmula kg/m^2 , em que kg representa o peso da pessoa em quilogramas e m^2 corresponde à sua altura em metros quadrados

2.3 Medição de mediadores inflamatórios pelo Ensaio de Luminex-Multiplex

A quantificação dos mediadores inflamatórios no plasma heparinizado dos voluntários foi realizada por meio de ensaio Multiplex, utilizando o kit Bio-Plex® Pro Human Cytokine Standard (Bio-Rad Laboratories). Esse método permite a análise simultânea de múltiplos analitos por imunensaio magnético, conduzido no equipamento Luminex (Bio-Plex® 200, Bio-Rad).

O painel de mediadores analisados incluiu: IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, CCL11, FGF-básico, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL5, TNF- α e VEGF. A análise dos dados foi realizada utilizando o software Bio-Plex™ xPONENT, versão 3.1 (Bio-Rad).

2.4 Análise por gráficos de radar

A distribuição dos níveis de citocinas e quimiocinas foi visualizada por meio de gráficos de radar, nos quais os mediadores foram categorizados como baixos produtores (\leq mediana global) ou altos produtores (\geq mediana global). A mediana global foi calculada considerando todo o conjunto de dados dos respectivos grupos (31).

No gráfico de radar, cada eixo representa um mediador específico, sendo que os indivíduos com níveis elevados desse mediador foram classificados como altos produtores. A interconexão dos eixos forma uma área poligonal, permitindo a visualização do equilíbrio entre fatores de crescimento, mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios. O aumento ou a redução dessa área indica uma maior ou menor contribuição de cada mediador para o perfil inflamatório geral.

2.5 Extração do DNA

Para a extração do DNA das amostras de PBMC, utilizou-se o protocolo com Trizol e clorofórmio. Resumidamente, foram adicionados 500 μL de Trizol e 200 μL de clorofórmio a cada amostra. O RNA presente na fase aquosa foi removido e, em seguida, adicionaram-se 150 μL de etanol 100% a cada uma delas. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 2000 g, a 4 °C, por 5 minutos, retirou-se a fase TRIzólica. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 10%, com pH 8,3, e as amostras foram incubadas por 30 minutos, com homogeneizações periódicas (inversão dos tubos). As amostras foram novamente centrifugadas a 2000 g, a 4 °C, por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Esse processo de lavagem com citrato de sódio, seguido de centrifugação, foi repetido duas vezes. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de álcool 75%, seguido de centrifugação a 2000 g, a 4 °C, por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Por fim, o pellet foi seco, e o DNA foi reconstituído com a adição de 60 μL de água grau molecular.

2.6 Identificação das Ilhas CpG Metiladas

Foram utilizados 500 ng de DNA, tratados com bissulfito de sódio, utilizando um kit de conversão de bissulfito especificado pela Illumina. Após o tratamento, as citosinas não metiladas foram convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permaneceram inalteradas. As amostras foram então desnaturadas e neutralizadas, preparando-as para a etapa de amplificação. O DNA desnaturado foi amplificado isotermicamente, em uma única etapa, durante a noite. Um processo enzimático controlado fragmentou o produto amplificado. Em seguida, o DNA fragmentado foi precipitado em isopropanol e centrifugado a 4 °C. O DNA precipitado foi ressuspensão em tampão de hibridização e distribuído em BeadChips. As amostras foram incubadas nos BeadChips durante a noite, permitindo a hibridização. O DNA amplificado e fragmentado ligou-se a sequências de 50 nucleotídeos de loci específicos, covalentemente acopladas a mais de 500.000 tipos de Beads.

Cada locus CpG foi representado por dois tipos de Beads: um correspondente ao estado metilado e outro ao estado não metilado. O DNA não hibridizado, ou hibridizado de forma não específica, foi lavado, e o BeadChip preparado para as etapas de extensão e coloração. Durante a extensão, incorporaram-se marcadores detectáveis no BeadChip, possibilitando a determinação do nível de metilação dos loci CpG analisados. Finalmente, o iScan System escaneou o BeadChip, utilizando um laser para excitar o fluoróforo incorporado no produto de

extensão de base única das esferas. O scanner registrou imagens de alta resolução da luz emitida pelos fluoróforos e gerou arquivos do tipo IDAT.

2.7 Estimativa da Idade Epigenética (DNAm Age)

Os arquivos IDAT foram importados para o software R, utilizando o pacote watermelon (versão 2.4.0) (Pidsley et al., 2013) para controle de qualidade, normalização e obtenção das matrizes de valores β de metilação. Essas matrizes contêm as informações sobre o grau de metilação das CpGs do genoma de cada amostra. O script utilizado encontra-se apresentado após as referências desta tese, no Anexo 1. Após a obtenção dos arquivos com as matrizes de valores β , utilizou-se o pacote metilclock (versão 1.5.0) (Pelegi-Siso et al., 2021) para estimar as idades biológicas e a aceleração do envelhecimento, com base em seis diferentes relógios de metilação. Indivíduos com aceleração do envelhecimento igual a zero não alteram a média da coorte, embora estejam incluídos nas análises, e é importante destacar que tanto jovens quanto idosos podem ou não apresentar aceleração do envelhecimento, o que é consistente com a influência de múltiplos fatores contextuais e comportamentais, como estilo de vida e exposições ambientais. A estimativa da aceleração da idade epigenética considerou a idade extrínseca, calculada com ajuste para as contagens de células sanguíneas. O número de CpGs consideradas em cada relógio, bem como a amostra utilizada para a seleção das CpGs associadas à idade biológica dos indivíduos, encontra-se descrito, abaixo, na Tabela 3. O script utilizado na análise encontra-se apresentado após as referências desta tese, no Anexo 2.

Tabela 3- Caracterização dos Diferentes Relógios Epigenéticos Utilizados:

Relógios	CpGs selecionadas	Amostra	Referência
Hannum	71	sangue	Hannum et al. (2013)
Horvath (skinHorvath)	391 CpGs	pele e sangue	Horvath et al. (2018)
PedBE	84	swabs epiteliais bucais	McEwen et al. (2019)
BLUP	319607	sangue	
EN	514	sangue	
Comprimento do telômero (TL)	140	sangue	Lu et al. (2019)

2.8 Sorologia

As análises sorológicas foram realizadas apenas nos participantes incluídos nas análises do Capítulo 1 desta tese. Nessas análises, foi possível identificar anticorpos IgG contra o vírus da dengue e o citomegalovírus (CMV). Todas as análises foram terceirizadas para o Laboratório Hermes Pardini (Belo Horizonte, Brasil), seguindo rigorosamente os protocolos institucionais referentes às técnicas de detecção, transporte de amostras e armazenamento.

A sorologia para dengue foi realizada por ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immunoassay* – EIA), permitindo a detecção quantitativa de IgG específica contra os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Já a detecção de anticorpos IgG contra o CMV foi conduzida por meio do ensaio enzimático de fluorescência (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay* – ELFA), permitindo a quantificação de anticorpos IgG específicos contra os antígenos dos sorotipos CMV-1 e CMV-2.

2.9 Análise de correlação de Spearman

A análise do coeficiente de correlação de Spearman foi realizada utilizando o software R, com o objetivo de avaliar múltiplas associações entre biomarcadores e determinar a força e a direção dos relacionamentos. O coeficiente de correlação de Spearman varia de -1 a +1, sendo que valores positivos indicam uma relação direta entre as variáveis (aumento simultâneo), enquanto valores negativos indicam uma relação inversa (quando uma variável aumenta, a outra diminui). Um coeficiente próximo de 0 sugere ausência de associação entre as variáveis analisadas.

As correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram representadas graficamente, em que o tamanho do círculo indica o nível de significância estatística: círculos maiores correspondem a valores de p menores, evidenciando associações mais robustas entre os biomarcadores analisados.

2.10 Imunofonotipagem por citometria de fluxo

As PBMCs (1×10^6) dos voluntários analisados no segundo capítulo desta tese foram submetidas à coloração de células mortas (LIVE/DEAD Aqua, ThermoFisher Scientific, cat. nº L34957) e, em seguida, marcadas com anticorpos conjugados a fluoróforos específicos para seus marcadores de superfície. O painel foi desenvolvido para a análise de linfócitos B de memória, células NK ativadas, exaustas e senescentes e linfócitos T senescentes e exaustos, conforme as estratégias de *gating* ilustradas nas Figuras 9, 10 e 11. Todas as informações sobre os marcadores, suas diluições e números de catálogo estão disponíveis na Tabela 4. A compensação de fluorescência foi realizada com esferas de captura de anticorpos (BD

Biosciences), garantindo a correção de possíveis desvios nas intensidades de fluorescência. As amostras de células foram analisadas em um citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences), acoplado a computadores com os softwares DIVA e FlowJo-10 (Tree Star), que possibilitaram a aquisição e análise dos dados.

Tabela 4. Painel de Citometria de Fluxo para Avaliação dos Fenótipos de Células NK, Linfócitos B de e Linfócitos T

	Antibody	Channel	Dilution Used	Catalog Number	Clone
NK Cell	CD3	AF 700	1:320	317340	OKT3
	CD16	PE Cy 5.5	1:100	555408	3G8
	CD25	PE	1:20	555432	M-A251
	CD56	PE Cy 7	1:200	340723	NCAM 16.2
	CD57	BV 421	1:640	317340	NK-1
	CD69	APC Cy7	1:20	557756	FN50
	CD 279 (PD-1)	BV 605	1:40	563245	EH12.1
	NKG2D	APC	1:20	558071	1D11
B Cell	CD24	FITC	1:160	555427	ML5
	CD 279 (PD-1)	BV 605	1:40	563245	EH12.1
	CD38	PE	1:20	555460	HIT2
	CD5	Percep Cy 5.5	1:80	341089	L17F12
	CD19	PE Cy 7	1:640	557835	SJ25C1
	IgD	AF 700	1:40	561302	IA6-2
	CD138	APC	1:20	347193	MI15
	CD27	APC Cy7	1:20	560222	M-T271
T Cell	CD20	BV 650	1:800	563780	2H7
	CD4	PE Cy 7	1:400	557852	SK3
	CD8	PE Dezzle 594	1:1200	562282	RPA-78
	CD25	PE	1:20	555432	M-A251
	CD278 (ICOS)	Percep Cy 5.5	1:20	562833	DX29
	CD57	BV 421	1:800	563896	NK-1
	CD279 (PD1)	BV 605	1:40	563245	EH12.1
	TIGIT	BV 650	1:160	741182	FAB7898G
	CD28	APC H7	1:20	561368	CD28.8
	CD3	AF 700	1:320	317340	OKT3
	CCR7	FICT	1:40	353216	G943H7
	KLG1	BV 711	1:40	138427	2F1/KLG1
Foxp3	APC Cy 7	1:20	21276106	3G3	
CD45RO	BV 785	1:80	304234	UCHL1	

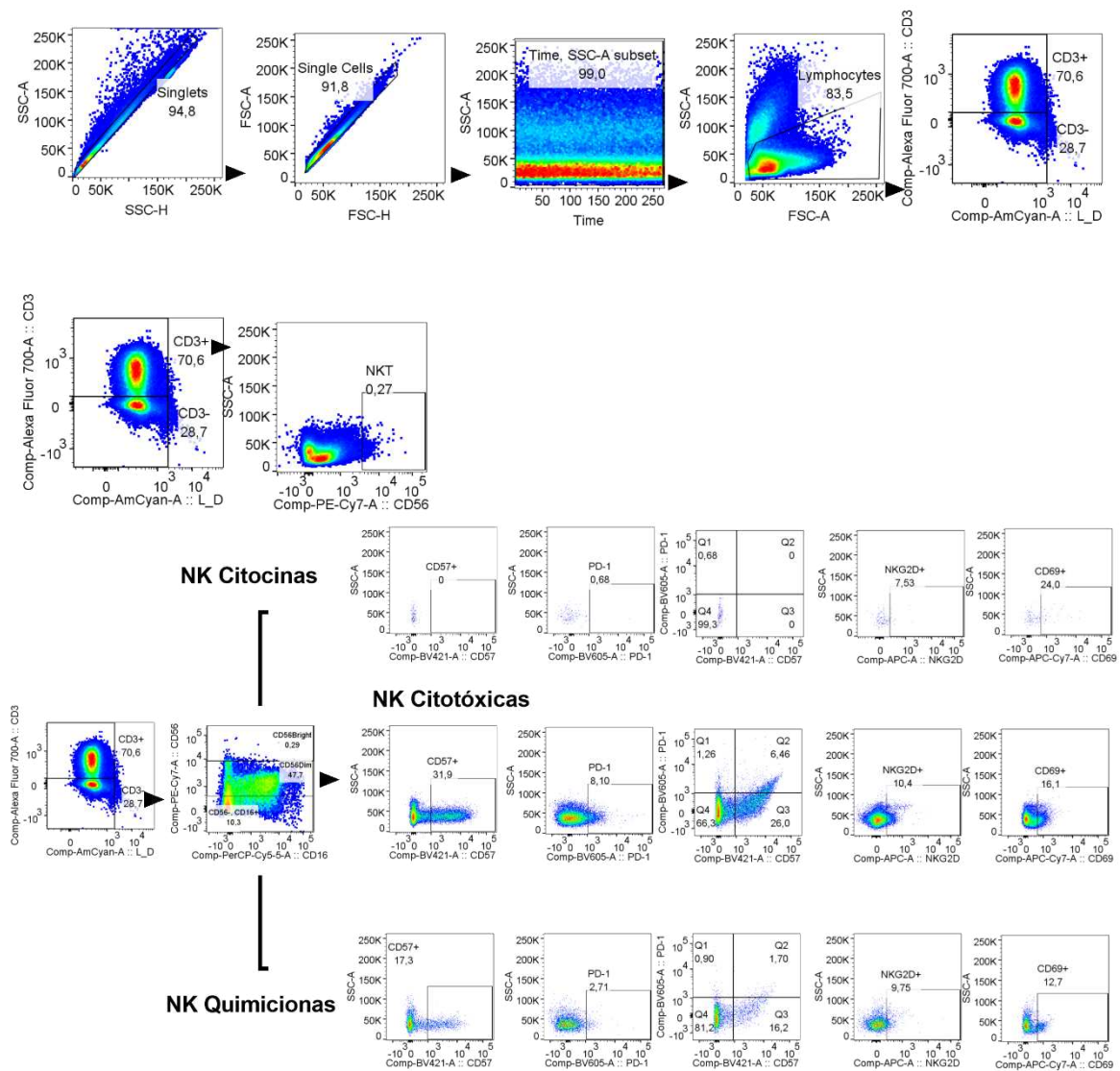


Figura 9-Estratégia de Gating das Células NK. Foram selecionadas as células vivas (L_D), e células T (L_D-, CD3+), dentro desse gating foram selecionadas as células NKT (L_D-, CD3+, CD56+). Também foram selecionadas as células que não eram do tipo T (L_D-, CD3-) e dentro desse gating foram selecionadas as células NK produtoras de quimiocinas (L_D-, CD3-, CD56-, CD16Bright), células NK de quimiocinas ativadas (L_D-, CD3-, CD56-, CD16Bright, NKG2D+) e células NK de quimiocinas senescentes (L_D-, CD3-, CD56-, CD16Bright, CD57+), células NL de quimiocinas exaustas (L_D-, CD3-, CD56-, CD16Bright, PD-1+) e células NK de quimiocinas senescentes e exaustas (L_D-, CD3-, CD56-, CD16Bright, PD-1+, CD57+). Foram selecionadas células NK produtoras de citocinas (L_D-, CD3-, CD56Bright), células NK de citocinas ativadas (L_D-, CD3-, CD56Bright, CD69+ e L_D-, CD3-, CD56Bright, NKG2D+), células NK de citocinas senescentes (L_D-, CD3-, CD56Bright, CD57+), células NK de citocinas exaustas (L_D-, CD3,

CD56Bright, PD-1+) e células NK de citocinas senescentes e exaustas (L_D-, CD3-, 29 CD56Bright, PD-1+, CD57+). Por fim, foram selecionadas as células NK citotóxicas (L_D-, CD3-, CD56Dim), células NK citotóxicas ativadas (L_D-, CD3-, CD56Dim, CD69+ e L_D-, CD3-, CD56Dim, NKG2D+), células NK citotóxicas senescentes (L_D-, CD3-, CD56Dim, CD57+), células NK citotóxicas exaustas (L_D-, CD3-, CD56Dim, PD-1+) e células NK citotóxicas senescentes e exaustas (L_D-, CD3-, CD56Dim, PD-1+, CD57+).

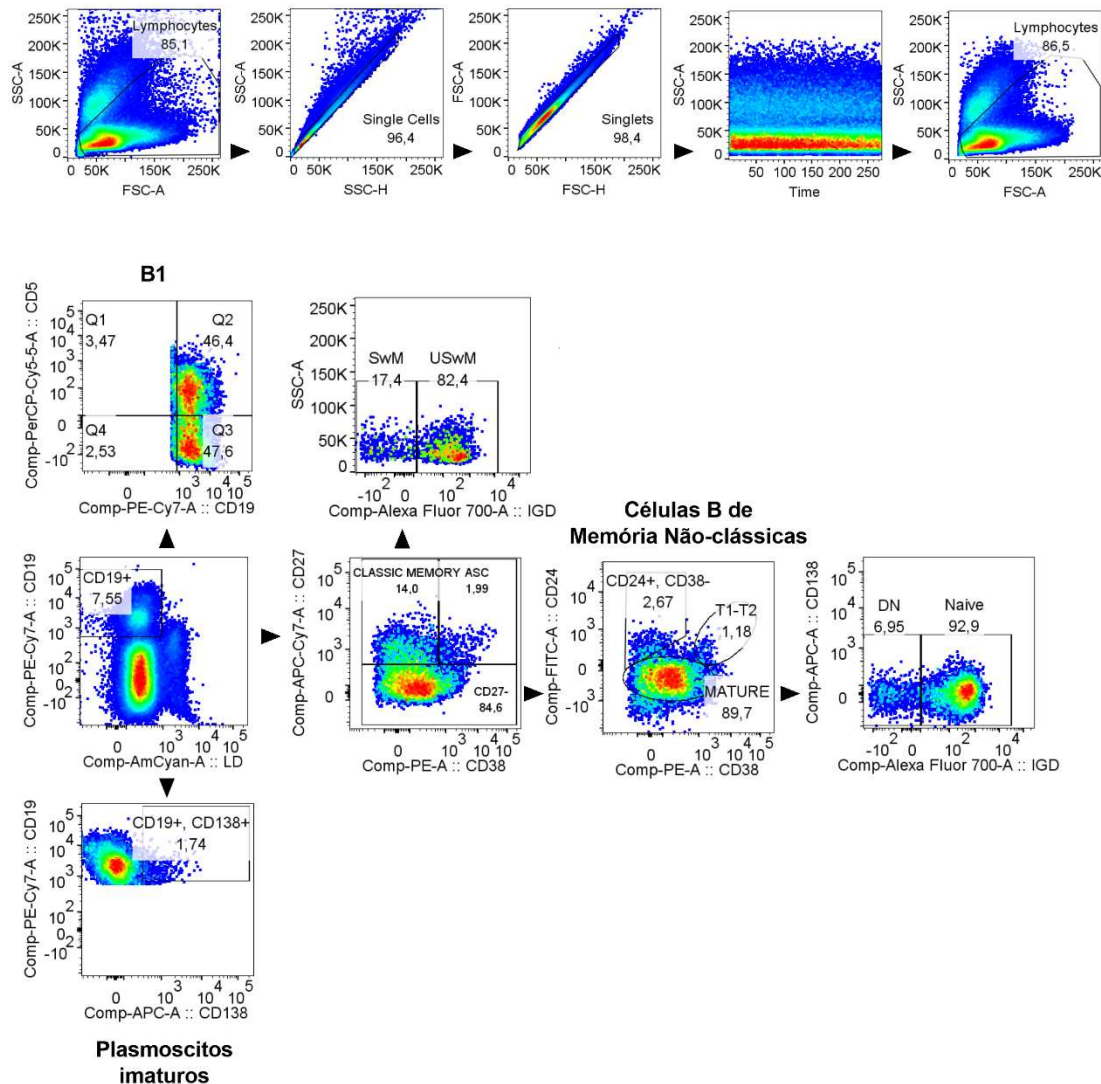


Figura 10-Estratégia de Gating dos Linfócitos B. Foram selecionadas as células vivas (L_D) e os linfócitos B (L_D-, CD19+). Dentro desse gating foram selecionadas as células secretoras de anticorpos (ASC) (L_D-, CD19+, CD27+, CD28hi), os plasmócitos imaturos (L_D-, CD19+, CD138+), os linfócitos B de memória não clássicos (L_D-, CD19+, CD27-,CD24+ CD38-/lo), os linfócitos B de memória maduros (L_D-, CD19+, CD27-,CD24-, CD38+/-), os linfócitos B de memória maduros duplo negativos (L_D-, CD19+, CD27-,CD24-, CD38+/-,

IgD-), linfócitos B naive maduros de memória (L_D-, CD19+, CD27-,CD24-, CD38+/-, IgD+) linfócitos B de memória transicionais T1/T2 (L_D-, CD19+, CD27-,CD24+ CD38hi), linfócitos B de memória clássicos (L_D-, CD19+, CD27+ CD38-), linfócitos B de memória clássicos,IgD- (L_D-, CD19+, CD27-,CD24+ CD38hi, IgD-), linfócitos B de memória clássicos IgD+ (L_D-, CD19+, CD27-,CD24+ CD38hi, IgD+) e linfócitos B-1a (L_D-, CD19+,CD5-).

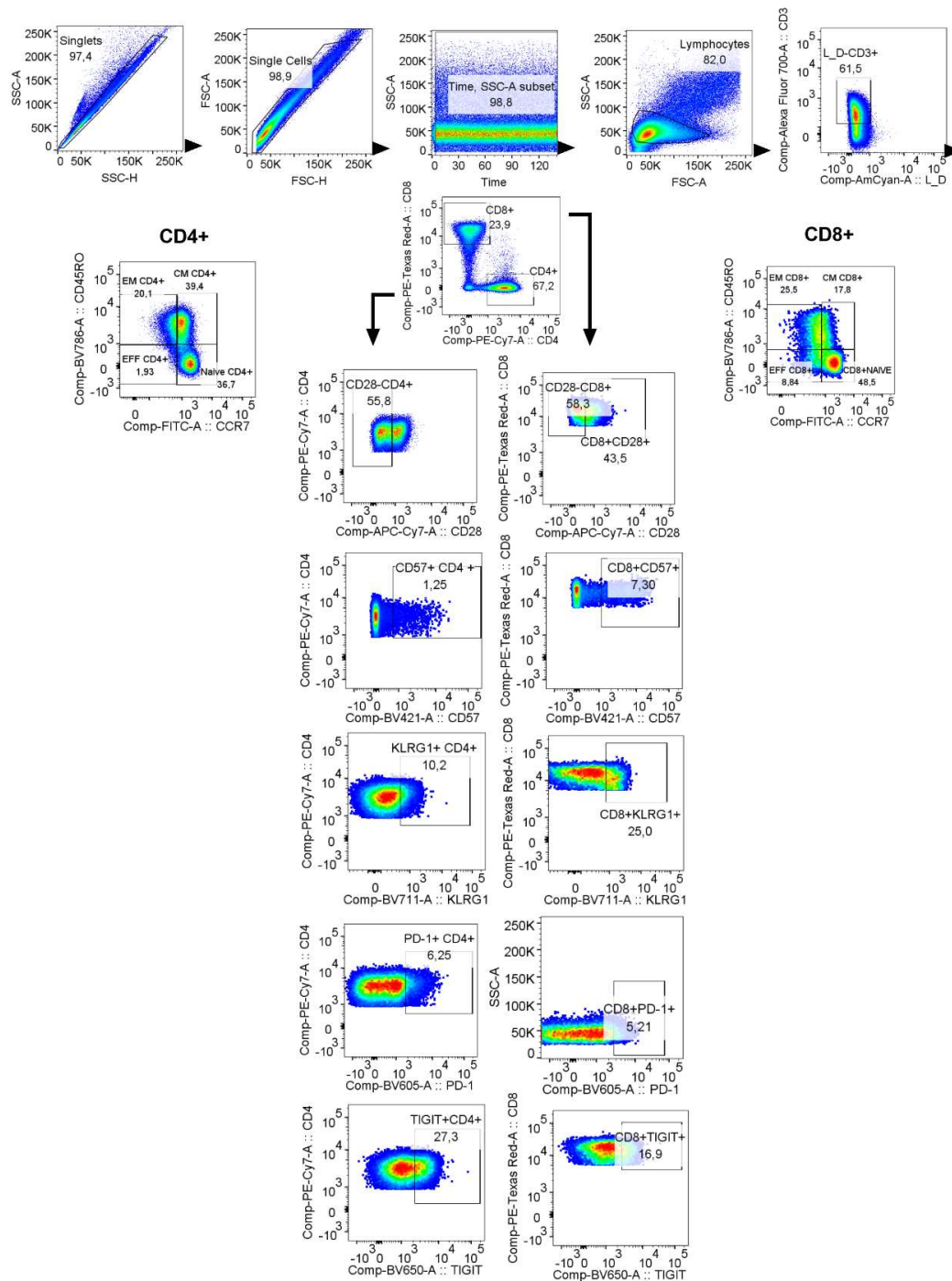


Figura 11-Estratégia de Gating dos Linfócitos T. Foram selecionadas as células vivas (L_D) e os linfócitos T (L_D-, CD3+). Dentro desse gating nós selecionamos os linfócitos T auxiliares (L_D-, CD3+, CD4+) e citotóxicos (L_D-, CD3+, CD8+) e identificamos as seguintes subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+: naïve (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD45RO⁻/CCR7⁺), linfócitos efetores (EFF) (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD45RO⁻/CCR7⁻), linfócitos de memória central (CM) (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD45RO⁺/CCR7⁺) e linfócitos de memória efetora (EM) (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD45RO⁺/CCR7⁻). Também foram identificados os linfócitos T senescente (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD28⁻), (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, CD57⁺) e (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, KLG1⁺); e os linfócitos T com perfil de exaustão (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, PD1⁺) e (L_D-, CD3+, CD4+ ou CD8+, TIGIT⁺).

2.11 Análises com base em bancos de dados públicos

As análises de emissão de PM₁₀, PM_{2.5}, CO, NO₂, O₃ e SO₂, apresentadas no segundo capítulo desta tese, foram realizadas com base nos dados disponibilizados pela Plataforma da Qualidade do Ar do Instituto de Energia e Meio Ambiente (IEMA). Calculamos a média diária de emissão de cada poluente e comparamos as médias referentes aos anos de 2015 a 2019. Também comparamos o número de hospitalizações por doenças do sistema respiratório, infecções e doenças parasitárias por 100.000 habitantes, de acordo com os registros do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), no mesmo período.

2.12 Análise estatística

A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada por meio de testes estatísticos paramétricos e não paramétricos, conforme a distribuição dos dados. Para variáveis com distribuição normal, foram utilizados o teste *t* de Student e a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. Para variáveis sem distribuição normal, foram empregados o teste U de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. A normalidade da distribuição das amostras foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov.

As características dos participantes foram descritas como média (desvio padrão) ou mediana (intervalo mínimo-máximo) para variáveis contínuas e como frequência absoluta (número de casos) para variáveis categóricas. Quando apropriado, os resultados foram apresentados graficamente como médias (desvio padrão) ou medianas (intervalo interquartil – IQR).

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando o software GraphPad Prism 8.0, considerando um nível de significância de $p < 0,05$.

3. CAPÍTULO 1

3.1 Viver em Área Endêmica de Doenças Infecciosas Está Associado a Diferenças nas Assinaturas de Imunossenescência

Considerando que a imunossenescência é um fenômeno influenciado por diversos fatores ambientais, neste Capítulo 1 conduzimos o estudo a partir de dois pontos centrais. Primeiramente, a imunossenescência é reconhecida como uma consequência da exposição antigênica crônica (Giron et al., 2024); entretanto, ainda carece de avaliação detalhada o impacto imunológico em indivíduos residentes em áreas endêmicas (AEs) para doenças infecciosas, em comparação com aqueles que vivem em áreas não endêmicas (ANEs). Em segundo lugar, conforme mencionado anteriormente, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que o envelhecimento saudável em áreas endêmicas é alcançado à custa de um aumento nas respostas imunológicas inatas, o que confere maior resistência a agentes infecciosos (Comin et al., 2007; Speziali et al., 2004). Diante desse contexto, o objetivo deste capítulo foi avaliar o envelhecimento biológico e o perfil de imunossenescência de indivíduos residentes em uma área endêmica (AE) no Brasil, caracterizada por elevada prevalência de esquistossomose, leishmaniose, hanseníase e infecções virais. O estudo apresentado neste capítulo foi publicado como artigo científico e encontra-se anexado ao final desta tese.

4. RESULTADOS CAPÍTULO 1

4.1 Indivíduos Residentes em Área Endêmica Apresentam Envelhecimento Epigenético Acelerado

Estudos prévios conduzidos por nosso grupo demonstraram que indivíduos residentes em área endêmica para doenças infecciosas apresentam uma aceleração do envelhecimento biológico, conforme estimado por marcadores epigenéticos baseados na metilação do DNA (Durso et al., 2022). No estudo anterior, essa análise incluiu voluntários de Governador Valadares, MG (área endêmica – AE) e dados públicos disponíveis de indivíduos de São Paulo, SP (área não endêmica – ANE) (Durso et al., 2022). Neste estudo, também comparamos o envelhecimento epigenético dos voluntários, utilizando uma coorte de outra cidade, Belo Horizonte, MG, como amostra de uma ANE. As análises epigenéticas confirmaram que indivíduos residentes em AE apresentaram um envelhecimento acelerado em relação àqueles que vivem em ANE, conforme evidenciado por seis diferentes relógios epigenéticos: skinHovarth (Fig. 12a), PedBE (Fig. 12b), Wu (Fig. 12c), TL (Fig. 12d), BLUP (Fig. 12e) e EN (Fig. 12f).

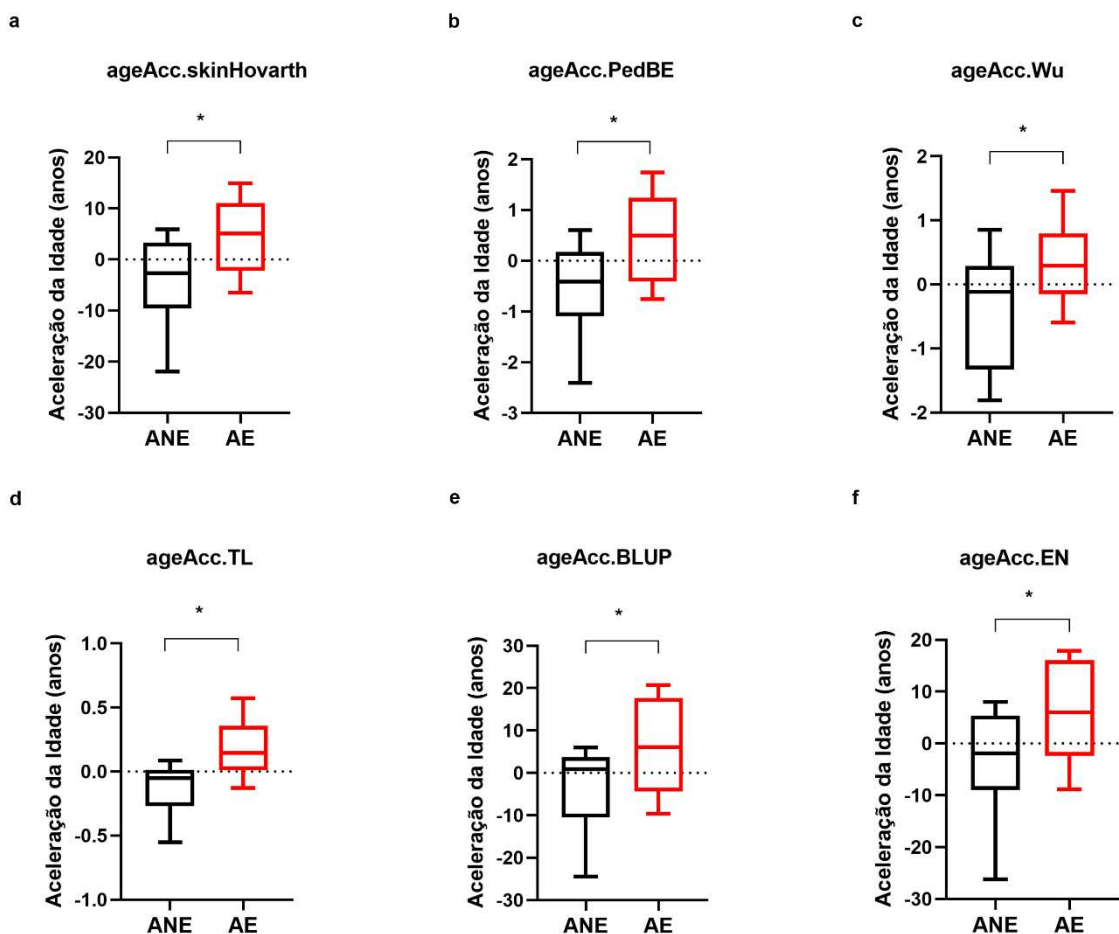


Figura 12 – Relógios epigenéticos construídos a partir de cálculos da metilação do DNA de indivíduos residentes em área endêmica (AE) e em área não endêmica (ANE).

(a-f) Aceleração do envelhecimento biológico em indivíduos residentes em ANE, representados por boxplots pretos (n = 11), em comparação com indivíduos residentes em AE, representados por boxplots vermelhos (n = 11). Foram utilizados os relógios *skinHorvath*, *PedBE*, *Wu*, *TL*, *BLUP* e *EN* do pacote *methylock* 1.5.0 do software R. O teste *t* não pareado foi realizado. As diferenças estatísticas foram representadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

4.2 Indivíduos Residentes em Área Endêmica para Doenças Infecciosas Apresentam Maior Produção de IL-12p70, IL-17A e IL-9

Considerando que o envelhecimento está associado a diversas alterações na resposta imune (McElhaney & Effros, 2009), investigamos as repercussões imunológicas nos perfis inflamatórios de nossa coorte. Indivíduos residentes em AE apresentaram uma produção significativamente elevada de IL-12p70 (Fig. 13a), IL-17A (Fig. 13b) e IL-9 (Fig. 13c) quando comparados aos residentes em ANE.

Por outro lado, indivíduos de ANE demonstraram maior produção de IL-6 (Fig. 13d), IL-1 β (Fig. 13e), IL-2 (Fig. 13f), IL-1Ra (Fig. 13g) e IL-10 (Fig. 13h). Além disso, os residentes em AE exibiram um perfil imunológico menos homogêneo e apresentaram uma maior frequência de altos produtores para PDGF-BB, VEGF, CXCL11, IL-9, IL-12p70 e IL-17A em comparação com os residentes em ANE (Fig. 13i-j).

Notavelmente, mais de 60% dos indivíduos em AE testaram positivo para CMV, enquanto 80% foram sororreativos para o vírus da dengue. Em contraste, entre os indivíduos de ANE, apenas 6% apresentaram positividade para CMV e dengue (Tabela 5).

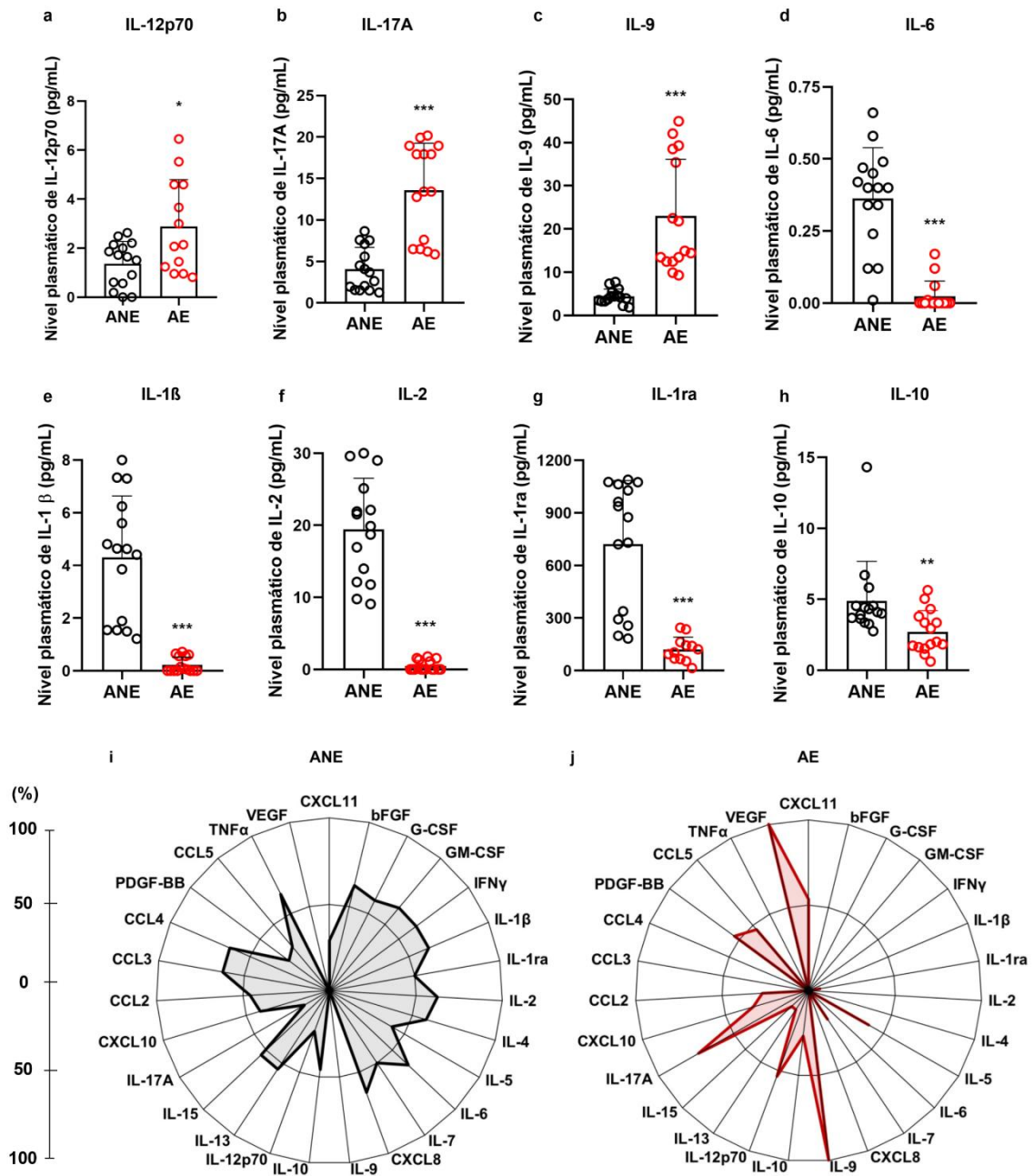


Figura 13 -Perfil global de mediadores séricos de indivíduos que residem em área endêmica (AE) e não endêmica (ANE).

Comparação da produção de (a) IL-12p70, (b) IL-17A, (c) IL-9, (d) IL-6, (e) IL-1β, (f) IL-2, (g) IL-1ra e (h) IL-10 entre indivíduos residentes em ANE (barras pretas, n = 15) e aqueles residentes em AE (barras vermelhas, n = 15). (i) Gráfico de radar ilustrando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos residentes em ANE (n = 15). (j) Gráfico de radar

representando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos residentes em AE (n = 15). Nos gráficos de radar, cada eixo representa a porcentagem (%) de voluntários que exibem uma alta frequência de produção de mediadores inflamatórios, conforme indicado pela linha à esquerda. A área poligonal central reflete o perfil geral de cada grupo. A produção de mediadores inflamatórios foi avaliada por meio do ensaio *Luminex*. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, com significância representada por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

Tabela 5. Prevalência de infecções por CMV e Dengue dos indivíduos do grupo controle negativo (NC) residentes em áreas não endêmicas (ANE) e endêmicas (AE), com base em análise sorológica

	Indivíduos controle negativo residentes de ANE (n=15)	Indivíduos controle negativo residentes de AE (n=15)
CMV	6%	66,6%
Dengue	6%	80%

A tabela apresenta a positividade de anticorpos IgG específicos contra os quatro sorotipos do vírus da dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) e contra os sorotipos do citomegalovírus humano (CMV-1 e CMV-2).

4.3 Indivíduos de Área Endêmica com Sintomas Semelhantes à Gripe ou COVID-19 Apresentam Maior Produção de Mediadores Plasmáticos

Alterações na atividade imunológica associadas ao envelhecimento podem aumentar a vulnerabilidade a doenças infecciosas (Franceschi & Campisi, 2014). Neste estudo, investigamos diferenças na produção de mediadores inflamatórios em resposta a infecções virais entre as duas coortes analisadas. Para isso, comparamos participantes residentes em área endêmica para doenças infecciosas (AE) e indivíduos de área não endêmica (ANE) que apresentaram sintomas semelhantes aos da gripe (síndrome gripal, FLS) ou infecção por COVID-19.

Os resultados indicaram que indivíduos com sintomas gripais e os indivíduos com COVID-19 residentes na AE exibiram maior produção de IL-12p70 (Fig. 14a), IL-6 (Fig. 14b), IL-1 β (Fig. 14c), IL-2 (Fig. 14d) e IL-1ra (Fig. 14e) em comparação com os residentes de ANE. Além disso,

os indivíduos da AE infectados por COVID-19 demonstraram níveis significativamente elevados de IL-10 em relação aos indivíduos ANE (Fig. 14f).

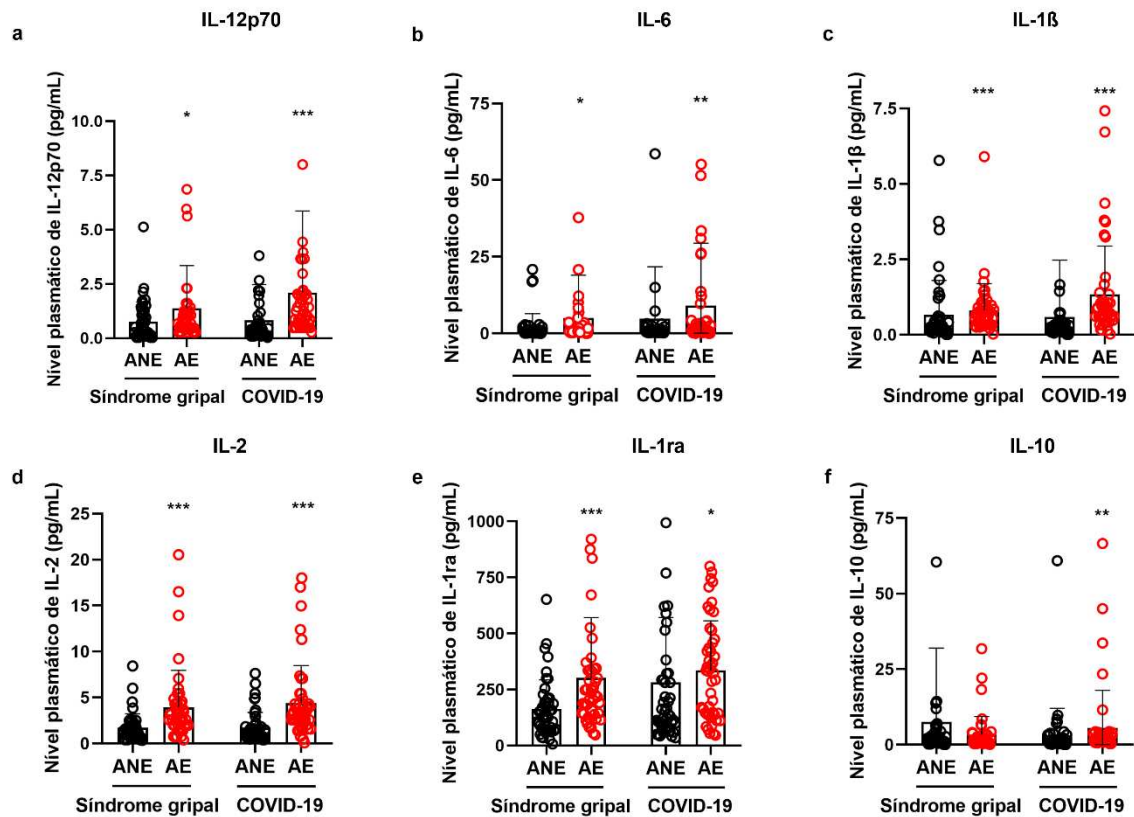


Figura 14 – Níveis de mediadores séricos em indivíduos com síndrome gripal (Flu-like) ou da COVID-19 que residem em área endêmica (AE) e não endêmica (ANE).

Comparação da produção de (a) IL-12p70, (b) IL-6, (c) IL-1β, (d) IL-2, (e) IL-1ra e (f) IL-10 em indivíduos com síndrome gripal (Flu-like, n = 45) ou da COVID-19 (n = 47), residentes em ANE, representados por barras pretas, e em AE, representados por barras vermelhas. A produção de mediadores inflamatórios foi avaliada por meio do ensaio *Luminex*. O teste de Mann-Whitney foi realizado, e as diferenças estatísticas foram representadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***).

4.4 Perfil de Altos Produtores de Indivíduos Infectados: Área Endêmica vs. Área Não Endêmica

Além das diferenças quantitativas na produção de citocinas, também observamos frequências mais elevadas de altos produtores de mediadores inflamatórios, anti-inflamatórios, quimiocinas

e fatores de crescimento entre os indivíduos residentes em AE, tanto no grupo com síndrome gripal (Fig. 15a-b) quanto no grupo com COVID-19 (Fig. 15c-d).

Notavelmente, a análise do perfil inflamatório global indicou que indivíduos residentes em AE e ANE apresentaram perfis imunológicos semelhantes, independentemente do tipo de infecção viral (Fig. 15c-d).

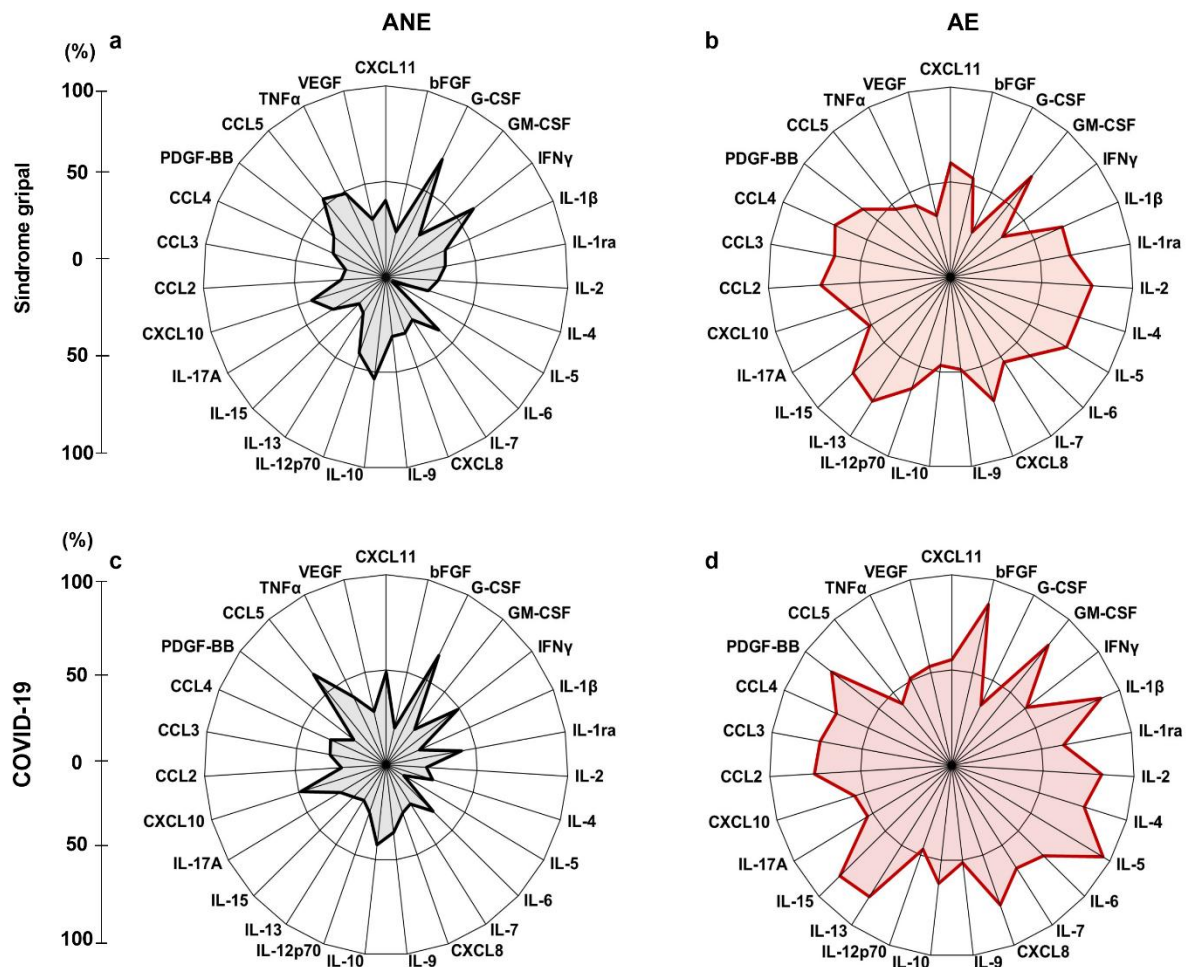


Figura 15– Padrão global de mediadores séricos em indivíduos infectados que residem em área endêmica (AE) e não endêmica.

(a) Gráfico de radar ilustrando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos com sintomas semelhantes aos da gripe, residentes em ANE (n = 45). (b) Gráfico de radar representando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos com síndrome gripal (Flu-like), residentes em AE (n = 45). (c) Gráfico de radar mostrando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos com COVID-19, residentes em ANE (n = 47). (d) Gráfico de radar exibindo a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos com COVID-19, residentes

em AE (n = 47). Nos gráficos de radar, cada eixo representa a porcentagem (%) de voluntários que apresentam alta frequência de produção de mediadores inflamatórios, conforme indicado pela linha à esquerda. A área poligonal central reflete o perfil geral de cada grupo. A produção de mediadores inflamatórios foi avaliada por meio do ensaio *Luminex*.

4.5 Indivíduos de Área Endêmica Apresentam Correlações Distintas entre Mediadores Inflamatórios e Idade Epigenética

O envelhecimento está associado a um estado de inflamação crônica de baixo grau, conhecido como *inflammaging* (De Martinis et al., 2005a; Fulop et al., 2018). Considerando que indivíduos residentes em AE apresentaram envelhecimento epigenético acelerado e um perfil inflamatório distinto em relação aos indivíduos ANE, buscamos identificar biomarcadores associados ao envelhecimento biológico por meio da comparação de matrizes de correlação.

O correlograma revelou que indivíduos residentes em AE apresentaram correlações positivas mais intensas entre mediadores inflamatórios do que aqueles residentes em ANE (Fig. 16a-b). Além disso, a idade epigenética apresentou correlações positivas distintas entre os grupos. Em indivíduos AE (Fig. 16c), foi positivamente correlacionada, em ordem crescente, com CXCL8, CCL5, CCL4, IL-5, CCL3, TNF- α , IL-17A, CXCL11, IL-9, IL-6, bFGF, CXCL10, G-CSF, IL-7, CCL2, IL-4, VEGF e GM-CSF. Já nos indivíduos ANE, a idade epigenética correlacionou-se positivamente, em ordem crescente, com IL-17A, CCL2, IL-4, IL-10, CXCL11, IL-12p70, IL-7, CCL5 e IL-9 (Fig. 16d).

Esses achados reforçam a hipótese de que indivíduos residentes em áreas endêmicas para doenças infecciosas apresentam um perfil imunológico distinto e um envelhecimento epigenético acelerado, possivelmente influenciado pela exposição recorrente a patógenos e inflamação crônica.

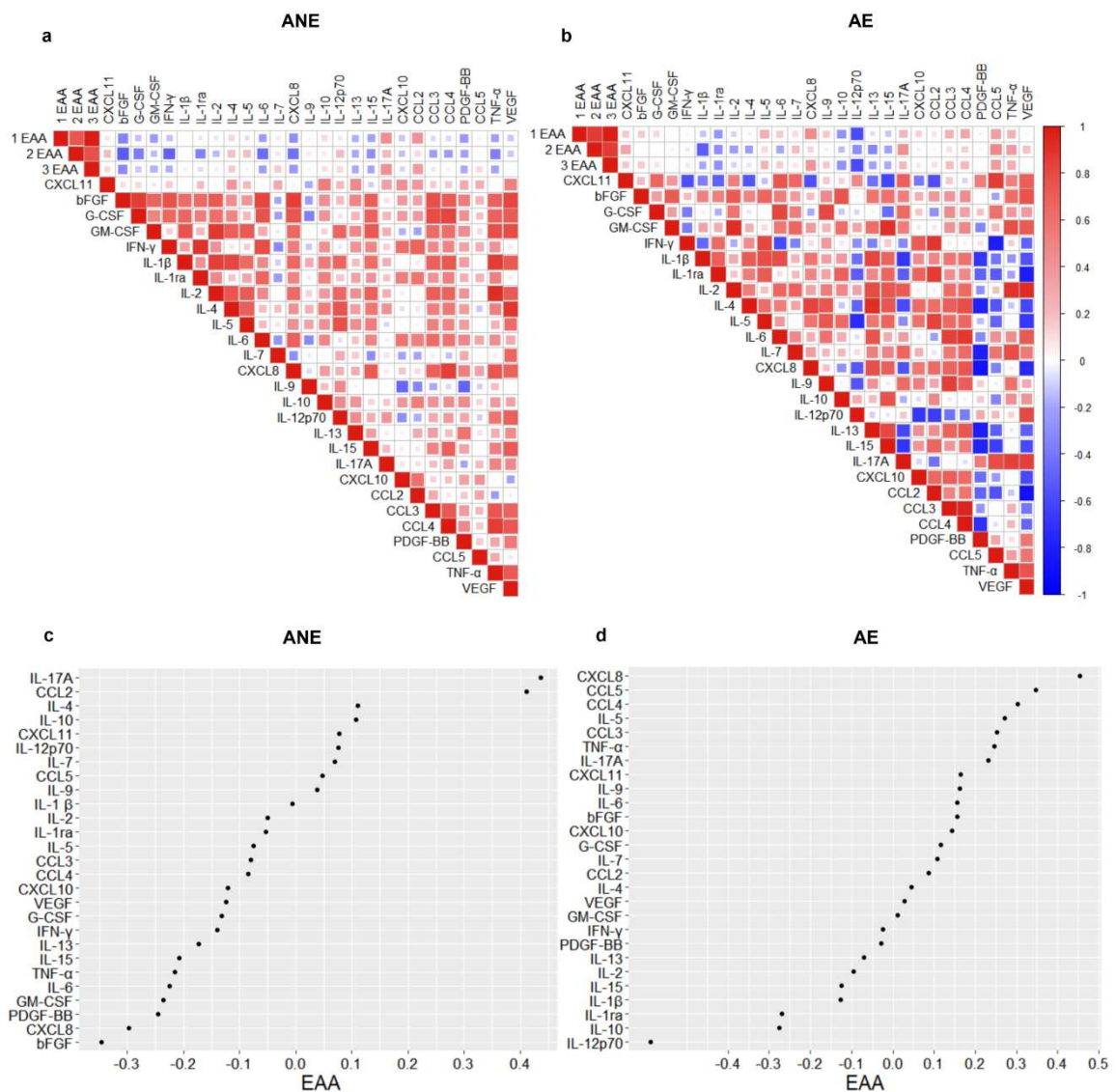


Figura 16 – Correlações entre os mediadores e a idade biológica em indivíduos que residem em área endêmica (AE) e não endêmica (ANE).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre citocinas plasmáticas, quimiocinas e fatores de crescimento com a aceleração do envelhecimento biológico ($1EAA = skinHorvath$, $2EAA = PedBE$ e $3EAA = BLUP$) em indivíduos residentes em ANE ($n = 11$) e (b) em AE ($n = 11$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre a aceleração do envelhecimento biológico ($EAA = skinHorvath$) e a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento plasmáticos em indivíduos residentes em ANE ($n = 11$) e (d) em AE ($n = 11$). A exibição apresenta correlações variando de 0,4 a -0,3 para ANE e de 0,5

a -0,5 para AE. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos

5. DISCUSSÃO CAPÍTULO 1

Fatores ambientais, como o estilo de vida, desempenham papel crucial na promoção do envelhecimento saudável. Enquanto o envelhecimento cronológico ocorre a uma taxa fixa, a taxa de envelhecimento biológico pode variar significativamente entre os indivíduos (Pu et al., 2024). A idade biológica pode ser estimada por meio de relógios epigenéticos, os quais são baseados em padrões de metilação do DNA (Field et al., 2018).

Com o objetivo de investigar se a exposição frequente a antígenos infecciosos está associada ao envelhecimento acelerado, utilizamos seis relógios epigenéticos para comparar a idade biológica de indivíduos residentes em uma área endêmica (AE) com a daqueles residentes em uma área não endêmica (ANE). Nossos achados indicaram que os indivíduos residentes em AE apresentam envelhecimento epigenético acelerado em todos os relógios de metilação analisados (Fig. 12a-f). Esses resultados são consistentes com os de um estudo prévio conduzido por nosso grupo, apesar do uso de uma coorte distinta na ANE, correspondente à cidade de São Paulo (Durso et al., 2022).

Dentre as diversas modificações associadas ao envelhecimento e à imunossenescência, uma das mais proeminentes é o fenômeno do *inflammaging*, caracterizado pelo aumento da produção sistêmica de IL-1, IL-6 e TNF- α (Ajoobady et al., 2024). No presente estudo, diferentemente da investigação anterior, analisamos a produção de mediadores inflamatórios em ambas as coortes e identificamos que os indivíduos residentes em AE apresentaram aumento na produção de IL-12p70 (Fig. 13a), IL-17A (Fig. 13b) e IL-9 (Fig. 13c). Em contraste, os residentes em ANE demonstraram níveis mais elevados de IL-6 (Fig. 13d), IL-1 β (Fig. 13e), IL-1ra (Fig. 13f), IL-2 (Fig. 13g) e IL-10 (Fig. 13h).

Embora nossos resultados indiquem maior produção de IL-6 (Fig. 13d) e IL-1 β (Fig. 13e) nos residentes de ANE, citocinas tipicamente associadas ao *inflammaging*, é importante ressaltar que os indivíduos de ambas as coortes apresentavam a mesma idade cronológica. Além disso, este estudo não se concentra exclusivamente em indivíduos idosos, mas em duas coortes com perfis distintos de envelhecimento biológico. O envelhecimento é um processo contínuo ao longo da vida, iniciando-se no nascimento, o que reforça a necessidade de abordagens que considerem fatores ambientais e imunológicos na determinação da idade biológica.

A IL-12p70 é composta pelas subunidades p35 e p40, que se combinam para formar a citocina bioativa. Essa interleucina desempenha papel fundamental na produção de IFN- γ e na ativação

de células Th1 (Gee et al., 2009). A IL-17A é predominantemente secretada por células Th17 em resposta à IL-1 β e à IL-23, sendo essencial para a imunidade contra fungos e bactérias e está relacionada à patogênese de doenças inflamatórias crônicas, como a doença de Crohn, e de doenças autoimunes, como a esclerose múltipla (Mills, 2023). A IL-9, por sua vez, é uma citocina pleiotrópica produzida por células Th2, ILC2s, mastócitos e basófilos, com funções importantes na imunidade do tipo 2, na alergia e na resposta imune a tumores (Pajulas et al., 2023).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, secretada principalmente por macrófagos, sendo essencial na regulação de distúrbios inflamatórios, como infecções virais (Aliyu et al., 2022; Gubernatorova et al., 2020). A IL-1 β , também produzida por macrófagos, é ativada pelo inflamassoma, um complexo regulador da resposta imune, sendo clivada pela caspase-1. Além de desempenhar um papel protetor contra patógenos, a IL-1 β está envolvida na regulação de respostas estéreis, bem como na proliferação, diferenciação e apoptose celular (Bent et al., 2018).

Em contrapartida, a IL-1ra atua como um inibidor natural da IL-1 β , funcionando como antagonista do receptor de interleucina-1 (Yazdi & Ghoreschi, 2016). O aumento na produção de IL-1ra observado em indivíduos de ANE pode representar uma resposta regulatória destinada a conter a produção elevada de IL-1 β . Por fim, a IL-10 exerce potentes efeitos imunossupressores, sendo essencial para a modulação da resposta inflamatória e para a manutenção da homeostase imunológica, tanto em contextos fisiológicos, como na mucosa intestinal, quanto em contextos patológicos (Wang et al., 2019).

Esses achados reforçam a hipótese de que fatores ambientais e a exposição a patógenos influenciam tanto o envelhecimento epigenético quanto a regulação da resposta inflamatória, contribuindo para um perfil imunológico distinto entre indivíduos residentes em áreas endêmicas e não endêmicas.

Por outro lado, a IL-2 apresenta funções complexas e, por vezes, opostas, desempenhando papel essencial tanto na promoção da inflamação quanto na supressão da resposta imune. Essa citocina está envolvida na proliferação e diferenciação de células T, facilitando a geração de células efetoras e de memória, além de ser fundamental para a manutenção de células T reguladoras (Abbas et al., 2018).

Em resposta a estímulos imunogênicos, a imunidade adaptativa normalmente se polariza para diferentes vias, como Th1, Th2 ou Th17. Entretanto, nossos dados revelaram ausência de

polarização no perfil inflamatório dos indivíduos residentes em AE, os quais apresentaram níveis elevados de citocinas inflamatórias associadas a múltiplas funções imunológicas. Em contraste, os indivíduos residentes em ANE demonstraram um perfil mais equilibrado, caracterizado pela produção simultânea de citocinas inflamatórias precoces e citocinas anti-inflamatórias. Esses achados sugerem que, em estado basal, os indivíduos que vivem em AE apresentam um perfil imunológico substancialmente distinto daqueles que vivem em ANE.

A inflamação é um processo fisiológico essencial para diversas funções biológicas, incluindo embriogênese, reparo tecidual e defesa imunológica (Ramos, 2012). Um perfil imunológico equilibrado é considerado um marcador de saúde, uma vez que a inflamação crônica está associada a disfunções fisiológicas e pode acelerar o envelhecimento biológico. Estudos prévios demonstraram que a inflamação persistente está implicada em condições como infecção por citomegalovírus (CMV) (Pawelec, 2014), doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico (Mazzone et al., 2019), e síndromes metabólicas, incluindo obesidade e diabetes tipo 2 (Ling & Rönn, 2019).

Apesar das diferenças observadas na produção de mediadores inflamatórios entre os grupos analisados, os participantes mantiveram um estado inflamatório subclínico, caracterizado por baixa intensidade, sem relatos de sintomas. Além disso, não foram identificadas diferenças significativas em idade, sexo ou presença de comorbidades entre os grupos estudados (Tabela 1). No entanto, a alta prevalência de soropositividade para CMV (60%) e dengue (80%) nos indivíduos de AE (Tabela 5) sugere que infecções prévias possam ter impacto relevante no perfil inflamatório desses indivíduos (Hofstee et al., 2023).

Um artigo de revisão recente discute a improbabilidade da existência de uma assinatura universal do *inflammaging*, uma vez que o conjunto de estressores que resultam na imunossenescência varia conforme a espécie, o contexto ambiental ou mesmo o indivíduo (Franck et al., 2025). Os autores destacam estudos que mostram que populações não industrializadas apresentam baixas taxas de doenças associadas ao envelhecimento quando comparadas a populações industrializadas (Kaplan et al., 2017; Gurven et al., 2013; Rowan et al., 2021; Gatz et al., 2023). Entretanto, essas populações exibem níveis persistentemente elevados de mediadores inflamatórios, em decorrência do ambiente de alta carga infecciosa. Os trabalhos citados indicam que populações com estilo de vida de subsistência, caracterizado por intensa atividade física e dieta minimamente processada, rica em fibras e carboidratos (Gurven et al., 2013; Kraft et al., 2018), associadas à exposição contínua a patógenos, especialmente

helmintos, apresentam um perfil inflamatório distinto (Blackwell et al., 2016; Gurven et al., 2009, 2008).

Além disso, relógios epigenéticos sugerem que a idade de metilação é mais baixa em adultos dessas populações em comparação a outras, indicando que, nesse contexto, a inflamação pode não acelerar o envelhecimento (Horvath et al., 2016). De forma contrastante ao presente estudo, que compara áreas endêmicas e não endêmicas, nossos dados demonstram que a exposição antigênica crônica está associada a maior idade de metilação (Coelho et al., 2025).

Governador Valadares, área endêmica analisada neste trabalho, está localizada a aproximadamente 320 km a leste de Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais (MG). Trata-se da nona cidade mais populosa de MG, com cerca de 266 mil habitantes e 17 distritos distribuídos em uma área de 2.342 km². Historicamente, o município é conhecido pelo intenso fluxo migratório para os Estados Unidos, fator que contribuiu para o desenvolvimento de redes de comércio e serviços influenciadas por essa conexão internacional. Sua economia é predominantemente baseada nos setores de comércio e serviços.

A região apresenta elevada prevalência de doenças infecciosas, provavelmente em decorrência de múltiplos fatores, incluindo questões relacionadas ao saneamento básico e ao ambiente urbano. A esquistossomose está associada à ausência de saneamento adequado (Palasio et al., 2021); a leishmaniose depende da presença de vetores e reservatórios animais, sendo favorecida pelo acúmulo de lixo, habitações precárias e degradação ambiental (Khosravi et al., 2025); a hanseníase está relacionada ao contato próximo e à vulnerabilidade social, como condições de superlotação e pobreza (Pescarini et al., 2018); e a dengue é favorecida pela presença de lixo e de água parada, ambientes propícios à proliferação do mosquito transmissor (Abdullah et al., 2024). Dessa forma, trata-se de um contexto substancialmente distinto daquele observado nas populações não industrializadas descritas nos estudos anteriores, sendo provável que a aceleração do envelhecimento observada esteja mais relacionada ao desequilíbrio da resposta imune frente aos estressores ambientais do que simplesmente ao contato com múltiplos antígenos. Nossos estudos têm demonstrado que indivíduos com respostas imunes mais homogêneas, caracterizadas pela produção concomitante de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, exibem menor aceleração do envelhecimento biológico quando comparados àqueles com respostas mais heterogêneas.

Alterações na atividade imunológica associadas ao envelhecimento podem aumentar a vulnerabilidade a diversas doenças (Franceschi & Campisi, 2014; McElhaney & Effros, 2009).

Diante disso, investigamos se indivíduos residentes em AE apresentavam diferenças na produção de mediadores inflamatórios em resposta a infecções virais. Para tal, comparamos residentes de AE e ANE que desenvolveram síndrome gripal ou COVID-19 leve, de acordo com os critérios de classificação estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2020).

Nossos resultados demonstraram que indivíduos de AE diagnosticados com COVID-19 ou síndrome gripal apresentaram níveis aumentados de IL-12p70, IL-6, IL-1 β , IL-2 e IL-1ra em comparação com aqueles residentes em ANE (Fig. 14a-e). Além disso, pacientes de AE com COVID-19 apresentaram produção significativamente maior de IL-10 em relação aos indivíduos de ANE (Fig. 14f). De forma notável, os indivíduos residentes em AE exibiram maior frequência de altos produtores de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento, tanto entre aqueles com sintomas gripais (Fig. 15a, b) quanto entre os diagnosticados com COVID-19 (Fig. 15c, d).

Dessa maneira, os indivíduos residentes em AE não apenas demonstraram respostas imunológicas mais intensas a infecções virais quando comparados aos de ANE, como também apresentaram um perfil distinto de mediadores inflamatórios durante essas respostas. Propomos que essas diferenças possam ser explicadas pela combinação de dois fatores principais:

1. Um perfil inflamatório imunossensível, característico de indivíduos expostos a múltiplas infecções ao longo da vida.
2. A resposta imune desencadeada pelos antígenos virais aos quais os indivíduos foram expostos no momento do estudo.

Um estudo prévio corrobora essa hipótese ao demonstrar que adultos jovens coinfectados por CMV e pelo vírus Epstein-Barr já apresentavam um fenótipo de células T associado ao envelhecimento (Hofstee et al., 2023). Esses achados reforçam a necessidade de novas investigações sobre o impacto da exposição crônica a patógenos sobre o sistema imunológico e sua relação com o envelhecimento epigenético.

Uma das alterações mais significativas associadas ao envelhecimento é o declínio na atividade e na capacidade proliferativa das células, acompanhado pelo desenvolvimento de um fenótipo secretor associado à senescência (SASP). Células senescentes secretam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteases, desempenhando papel central na inflamação crônica (Ghosh & Capell, 2016; Wang et al., 2024).

A exposição contínua a antígenos infecciosos ao longo da vida induz ativação persistente do sistema imunológico, favorecendo o acúmulo de células T senescentes. Essas células, que integram o SASP, são características do processo de envelhecimento e estão associadas a disfunções imunológicas (Wang et al., 2024). Paralelamente, observa-se aumento na frequência de células T exaustas, caracterizadas pela elevada expressão de receptores inibitórios, redução da capacidade de produção de citocinas e comprometimento da função efetora após reexposição ao antígeno (Wherry, 2011). Esses fenótipos celulares estão diretamente associados a respostas menos eficazes à vacinação, maior fragilidade e maior suscetibilidade a doenças relacionadas à idade (Kennedy et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram que, embora indivíduos residentes em AE com COVID-19 apresentassem níveis mais elevados de mediadores inflamatórios quando comparados àqueles com sintomas gripais (Fig. 14c, d), o perfil inflamatório dos indivíduos de AE permaneceu semelhante, independentemente do tipo de infecção (Fig. 15b, d). O mesmo padrão foi observado entre os indivíduos residentes em ANE (Fig. 15a, c). Esses achados sugerem que fatores ambientais e estressores locais influenciam não apenas as taxas individuais de envelhecimento biológico, mas também os perfis imunológicos basais e as respostas imunes durante infecções virais.

Para investigar a existência de diferenças nos mediadores inflamatórios associados ao envelhecimento entre indivíduos de AE e ANE, correlacionamos três relógios epigenéticos com os níveis desses mediadores. A análise da matriz de correlação revelou maior número de correlações positivas e interações mais robustas entre os mediadores inflamatórios nos indivíduos de AE, em comparação ao grupo ANE (Fig. 16a, b).

Além disso, nos indivíduos de AE, a idade epigenética correlacionou-se positivamente, em ordem decrescente, com os seguintes mediadores inflamatórios: CXCL8, CCL5, CCL4, IL-5, CCL3, TNF- α , IL-17A, CXCL11, IL-9, IL-6, bFGF, CXCL10, G-CSF, IL-7, CCL2, IL-4, VEGF e GM-CSF (Fig. 13d). Em contraste, nos indivíduos de ANE, a idade epigenética apresentou correlação positiva, em ordem decrescente, com IL-17A, CCL2, IL-4, IL-10, CXCL11, IL-12p70, IL-7, CCL5 e IL-9 (Fig. 16c).

Propõe-se que o envelhecimento não represente apenas um processo de deterioração e declínio funcional, mas também envolva um mecanismo de remodelação adaptativa, permitindo ao organismo lidar com desafios imunológicos ao longo da vida (Franceschi et al., 2007; Fulop et al., 2018). Nesse contexto, o envelhecimento é caracterizado por mudanças compensatórias que

refletem a história imunológica individual. Nossos achados corroboram essa hipótese ao demonstrar que o ambiente e a exposição prévia a patógenos desempenham papel fundamental na configuração do sistema imunológico e na trajetória do envelhecimento epigenético.

Diversos estudos indicam que o envelhecimento pode ser acelerado por fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo dieta inadequada e consumo frequente de alimentos ultraprocessados (Friedman, 2020). No presente estudo, acrescentamos uma nova dimensão a essa compreensão ao demonstrar que a exposição contínua a agentes infecciosos em áreas endêmicas pode impactar significativamente tanto o perfil imunológico quanto o processo de envelhecimento dos indivíduos.

A intensa e persistente estimulação antigênica à qual os residentes dessas regiões estão submetidos provavelmente desempenha papel determinante nas diferenças imunológicas observadas. Esse achado sugere que o impacto da exposição a patógenos sobre a imunossenescência pode representar um fator crítico no envelhecimento populacional em diferentes regiões do mundo, não se restringindo ao contexto brasileiro. Assim, os dados apresentados são relevantes não apenas para a compreensão global dos mecanismos da imunossenescência, mas também para o desenvolvimento de estratégias voltadas à promoção do envelhecimento saudável.

Entretanto, o presente estudo apresenta algumas limitações. Apesar do pareamento das amostras por sexo, idade e ausência de comorbidades, o tamanho amostral foi reduzido, especialmente nos grupos de indivíduos assintomáticos para infecções respiratórias e negativos para COVID-19. Além disso, a caracterização fenotípica detalhada de células senescentes e exaustas por meio de imunofenotipagem teria sido fundamental para uma compreensão mais aprofundada do perfil imunossenesciente desses indivíduos.

Essas limitações reforçam a necessidade de estudos futuros com amostras populacionais ampliadas, a fim de confirmar os achados apresentados e aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos na interação entre exposição ambiental, sistema imunológico e envelhecimento biológico.

6. CAPÍTULO 2

6.1 Viver em Diferentes Contextos Urbanos Pode Influenciar o Ritmo e o Perfil da Imunossenescência

No capítulo anterior, mostramos que indivíduos residentes em áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas no Brasil apresentam envelhecimento epigenético acelerado, alterações na produção de mediadores inflamatórios e diferentes correlações entre a aceleração do envelhecimento e as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Coelho et al., 2025). Além disso, estudos já demonstraram que outros fatores geográficos que refletem o padrão de vida e os indicadores socioeconômicos impactam o envelhecimento (Yusipov et al., 2024; Hernandez et al., 2024).

Considerando que as diferenças nos fatores ambientais e geográficos, como doenças infecciosas endêmicas, diferenças culturais que impactam o estilo de vida e a exposição a poluentes podem influenciar o envelhecimento, neste capítulo, tivemos como objetivo avaliar o ritmo e o perfil de imunossenescência de indivíduos residentes em duas metrópoles brasileiras, Belo Horizonte e São Paulo, que apresentam características sociais, culturais, econômicas e urbanas bastante distintas.

Belo Horizonte (BH), capital do estado de Minas Gerais, conta com uma população superior a 2 milhões de habitantes, de acordo com o Censo Demográfico de 2022 (IBGE, 2023). Embora não seja uma cidade litorânea, destaca-se por sua expressiva arborização, com ampla presença de parques e áreas verdes. Sua economia é fortemente impulsionada nos setores secundário e terciário, além de apresentar significativa produção artística e cultural, especialmente no que se refere ao artesanato. Em contraste, São Paulo (SP) configura-se como a cidade mais populosa do país, com mais de 11 milhões de habitantes, conforme o mesmo censo (IBGE, 2023). Possui a maior economia urbana da América Latina, consolidando-se como um relevante polo financeiro. A cidade conta com uma ampla variedade de museus, teatros e espaços culturais, além de uma infraestrutura complexa e densa de transportes e serviços. Diante dessas distinções, acreditamos que as diferentes exposições ambientais às quais estão submetidos os indivíduos residentes em BH e SP possam influenciar tanto o ritmo quanto o perfil da imunossenescência observada nas duas coortes.

7. RESULTADOS CAPÍTULO 2

7.1 Análise Comparativa de Indicadores Populacionais e de Saúde Pública em BH e SP

Os dados apresentados na Tabela 6 revelam diferenças relevantes entre BH e SP em diversos indicadores demográficos, socioeconômicos e de saúde pública. Ambas as capitais apresentam níveis elevados de desenvolvimento humano, com IDH-M superior a 0,80, sendo o de BH um pouco maior (0,810) em comparação ao de SP (0,805). A expectativa de vida em BH (77,4 anos) também supera a de SP (76,8 anos). No que se refere à desigualdade de renda, o Índice de Gini é ligeiramente menor em BH (0,58) do que em SP (0,60).

A taxa de mortalidade infantil é de 9,8 por mil nascidos vivos em BH e 10,2 em SP; no entanto, esses valores aumentam significativamente nas periferias, alcançando 16,3 em BH e 18,5 em SP. A razão de mortalidade materna é de 55 por 100 mil nascidos vivos em BH e 60 em SP, sendo ainda mais alta entre mulheres negras, atingindo 82 em BH e 95 em SP. A diferença na expectativa de vida entre bairros ricos e pobres chega a 15 anos em BH e 14 anos em SP.

A cobertura da Estratégia Saúde da Família (ESF) é maior em BH (75%) do que em SP (68%). Quanto à densidade médica, BH possui 25,1 médicos por 10 mil habitantes e SP, 27,3; porém, esses profissionais estão concentrados nos centros urbanos (40 em BH e 45 em SP), enquanto nas periferias os números caem para 8 e 6, respectivamente. O Índice de Concentração (IC) de médicos é de 0,32 em BH e 0,38 em SP, sendo que valores mais próximos de zero indicam maior equidade. São Paulo apresenta um percentual maior de população com plano de saúde (48%) em comparação a BH (42%), mas registra um tempo médio de espera mais elevado para atendimentos no SUS: 18 dias, frente a 14 dias em BH.

Tabela 6. Comparativo de indicadores demográficos, socioeconômicos e de saúde pública entre BH e SP

Indicador	Belo Horizonte (MG)	São Paulo (SP)	Fonte	Ano
Expectativa de Vida (anos)	77.4	76.8	PNUD/IBGE	2010
IDH-M	0,810	0,805	Atlas Brasil (PNUD)	2010
Índice de Gini	0,58	0,60	IBGE	2010
Mortalidade Infantil (por 1.000 nascidos)	9.8 (periferia: 16.3)	10.2 (periferia: 18.5)	DataSUS	2022
Razão de Mortalidade Materna (por 100 mil)	55 (mulheres negras: 82)	60 (mulheres negras: 95)	Ministério da Saúde	2022
Diferença de Longevidade (IDSL)	15 anos (Sion vs. Serra)	14 anos (Moema vs. Grajaú)	Atlas Brasil (PNUD)	2010
Cobertura de Estratégia Saúde da Família (ESF)	75%	68%	Ministério da Saúde	2023
Médicos por 10 mil Habitantes	25.1 (centro: 40; periferia: 8)	27.3 (centro: 45; periferia: 6)	CFM	2020
Índice de Concentração (IC) de Médicos	0.32 (0 = equidade)	0.38	CFM/IPEA	2020
População com Plano de Saúde (%)	42%	48%	ANS/IBGE	2021
Tempo Médio para Atendimento no SUS (dias)	14 (urgência: 2)	18 (urgência: 3)	DataSUS	2022

Expectativa de Vida (anos): Média de anos que uma pessoa nascida em determinado local pode esperar viver, considerando as condições de saúde, sociais e econômicas vigentes.

IDH-M – Índice de Desenvolvimento Humano Municipal: Mede o desenvolvimento humano em nível municipal, considerando três dimensões: longevidade, educação e renda. Varia de 0 (pior) a 1 (melhor).

Índice de Gini: Mede a desigualdade de renda. Vai de 0 (igualdade total) a 1 (desigualdade máxima).

Mortalidade Infantil (por 1.000 nascidos vivos): Número de crianças que morrem antes de completar 1 ano de idade a cada 1.000 nascimentos vivos.

Razão de Mortalidade Materna (por 100 mil): Número de mortes maternas (relacionadas à gestação, parto ou puerpério) a cada 100 mil nascidos vivos.

IDSL – Índice de Diferença de Longevidade: Expressa a desigualdade na expectativa de vida entre diferentes grupos sociais ou territoriais. Quanto maior o índice, maior a diferença.

Cobertura da ESF – Estratégia Saúde da Família (%): Percentual da população coberta por equipes da ESF, principal modelo de atenção primária no SUS.

Médicos por 10 mil Habitantes: Número de médicos disponíveis para cada 10 mil habitantes, indicando a densidade de profissionais de saúde.

IC de Médicos – Índice de Concentração de Médicos: Mede a concentração dos médicos em determinadas áreas da cidade. Valores mais altos indicam maior concentração e menor distribuição equitativa.

População com Plano de Saúde (%): Percentual da população residente com acesso a planos ou seguros privados de saúde.

Tempo Médio para Atendimento no SUS (dias): Tempo médio que os usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) aguardam por atendimento em serviços de saúde.

7.2 Indivíduos Residentes em São Paulo Apresentam Envelhecimento Epigenético Acelerado em Relação à Indivíduos Residentes em Belo Horizonte

No capítulo anterior, demonstramos que indivíduos residentes em diferentes cidades podem apresentar variações na aceleração do envelhecimento biológico, estimado pelos relógios epigenéticos (Durso, 2022; Coelho, 2025). Considerando que as diferenças na exposição a antígenos, resultantes de variações demográficas, socioeconômicas e de saúde pública, podem estar associadas a padrões e ritmos distintos de imunossenescência, neste capítulo comparamos também o envelhecimento epigenético de indivíduos residentes em duas cidades brasileiras. Comparamos uma coorte de Belo Horizonte, MG, com uma de São Paulo, SP. Nossas análises epigenéticas revelam que os indivíduos residentes em São Paulo apresentaram envelhecimento epigenético acelerado em comparação àqueles que vivem em Belo Horizonte, conforme evidenciado por seis diferentes relógios epigenéticos: skinHorvath (Fig. 17a), PedBE (Fig. 17b), Wu (Fig. 17c), TL (Fig. 17d), BLUP (Fig. 17e) e EN (Fig. 17f).

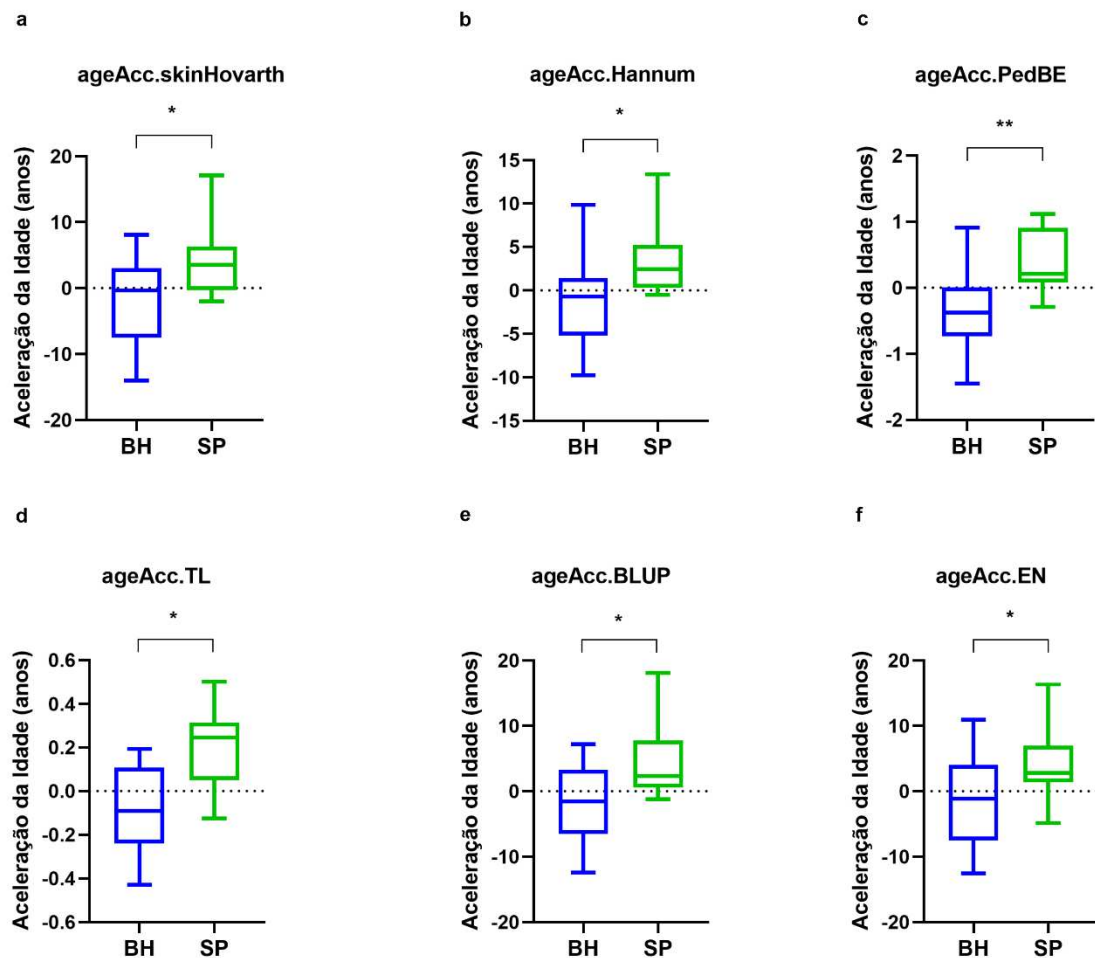


Figura 17 – Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam envelhecimento epigenético acelerado em comparação com aqueles que vivem em Belo Horizonte (BH). (a-f) Aceleração do envelhecimento biológico em indivíduos residentes em BH, representados por boxplots azuis (n = 10), em comparação com indivíduos residentes em SP, representados por boxplots verdes (n = 10). Foram utilizados os relógios *skinHorvath*, *PedBE*, *Wu*, *TL*, *BLUP* e *EN* do pacote *methylclock* 1.5.0 do software R. O teste *t* não pareado foi realizado. As diferenças estatísticas foram representadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)).

7.3 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Produção dos Mediadores Inflamatórios

Considerando que o envelhecimento pode estar associado a alterações no perfil inflamatório (Ajoalabady et al., 2024), nós mensuramos a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento para comparar as duas coortes. Nossos resultados mostraram que indivíduos residentes em BH apresentaram uma produção significativamente elevada de IL-6 (Fig. 18a),

IL-1 β (Fig. 18b), IL-1ra (Fig. 18c), TNF- α (Fig. 18d), IL-10 (Fig. 18e) quando comparados aos residentes em SP. Por outro lado, os indivíduos de SP demonstraram maior produção de IL-4 (Fig. 18f), IL-5 (Fig. 18g), IL-15 (Fig. 18h), CCL3 (Fig. 18i) e G-CSF (Fig. 18j).

Além disso, nossa análise de perfil global da produção dos mediadores inflamatórios mostrou que residentes de BH tem um perfil mais homogêneo e equilibrado na produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, apesar de exibir uma maior frequência de altos produtores em mais mediadores do que os residentes em SP (Fig. 18k). Em contraste, o perfil da produção dos mediadores inflamatórios dos residentes em SP é mais heterogêneo, chamando a atenção para a maior frequência de altos produtores de CCL3, IL-15, IL-13, IL-9, IL-5, IL-4 e G-CSF (Fig. 18l). Considerando que os indivíduos residentes em SP apresentaram um envelhecimento epigenético acelerado e um perfil inflamatório distinto em comparação aos indivíduos de BH, buscamos identificar biomarcadores associados ao envelhecimento biológico por meio da análise comparativa de matrizes de correlação.

Os correlogramas revelaram que os indivíduos residentes em SP apresentaram correlações positivas mais intensas e um número maior de correlações entre a aceleração do envelhecimento e os mediadores inflamatórios do que os residentes em BH (Fig. 19a-d). Além disso, a aceleração do envelhecimento epigenético dos residentes de BH exibiu correlações positivas, em ordem crescente, com IL-17A, CCL2, IL-4, IL-10, CXCL11, IL-12p70, IL-7, CCL5 e IL-9 (Fig. 19c). Por outro lado, o correlograma dos indivíduos residentes em SP demonstrou que a idade epigenética se correlacionou positivamente, em ordem crescente, com CXCL10, CCL2, IL1ra, IFN- γ , IL-4, bFGF, CXCL11, IL-5, CXCL8, IL-6, IL-13, IL-15, PDGF-bb, IL-2, GM-CSF, IL-10, IL-1 β , CCL7, IL-7, CCL5, VEGF e G-CSF (Fig. 19d).

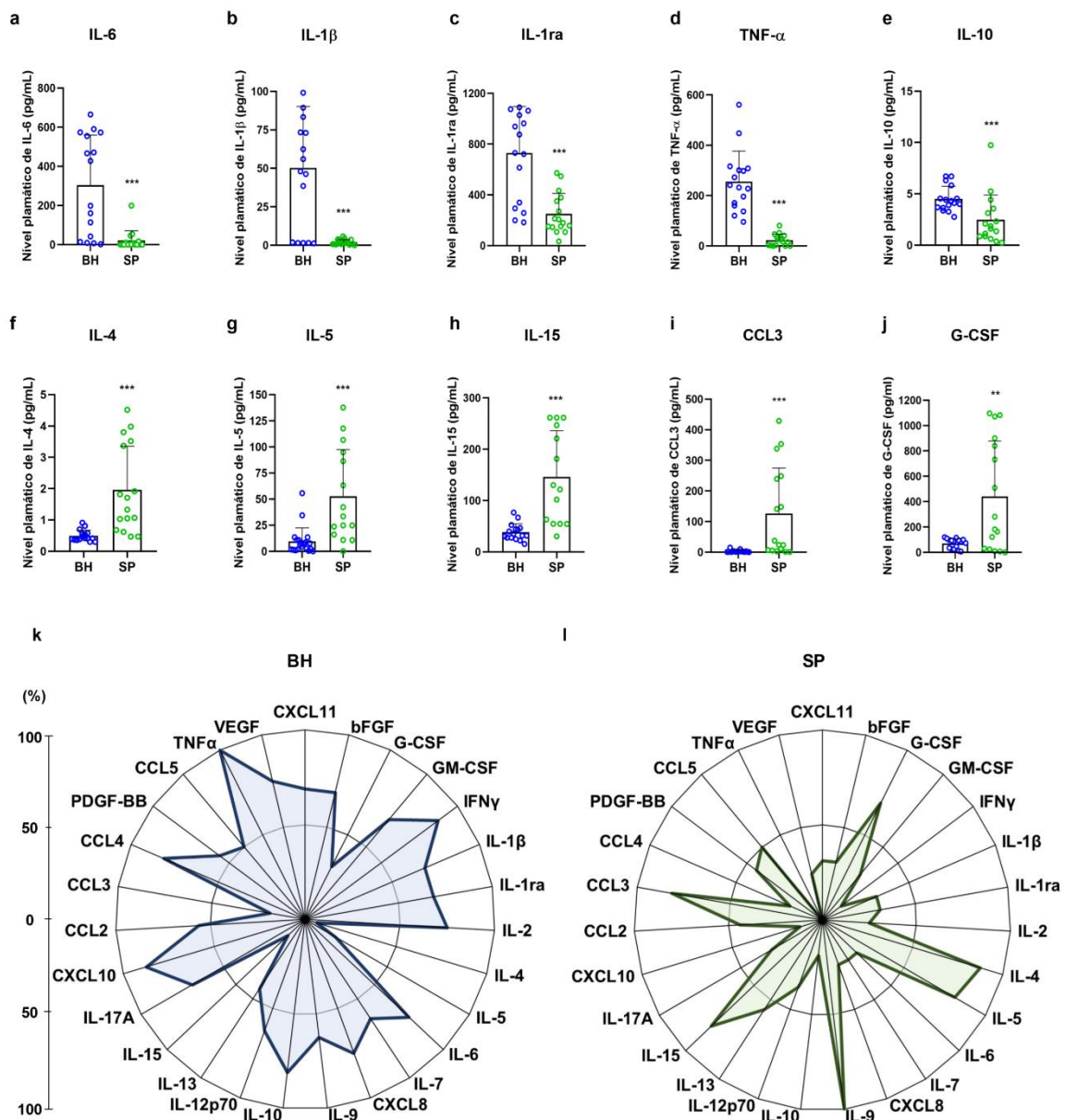


Figura 18– Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam diferenças na produção de mediadores inflamatórios em comparação com aqueles que vivem em Belo Horizonte (BH).

(a) Comparação da produção de IL-6, (b) IL-1 β , (c) IL-1ra, (d) TNF- α , (e) IL-10, (f) IL-4, (g) IL-5, (h) IL-15 (i) CCL3 e (j) G-CSF entre indivíduos residentes em Belo Horizonte (BH) (barras azuis, n = 16) e aqueles residentes em SP (barras verdes, n = 16). (k) Gráfico de radar ilustrando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos residentes em BH (n = 16). (l) Gráfico de radar representando a produção de mediadores inflamatórios em indivíduos residentes em SP (n = 16). Nos gráficos de radar, cada eixo representa a porcentagem (%) de voluntários que exibem uma alta frequência de produção de mediadores inflamatórios,

conforme indicado pela linha à esquerda. A área poligonal central reflete o perfil geral de cada grupo. A produção de mediadores inflamatórios foi avaliada por meio do ensaio *Luminex*. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, com significância representada por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)).

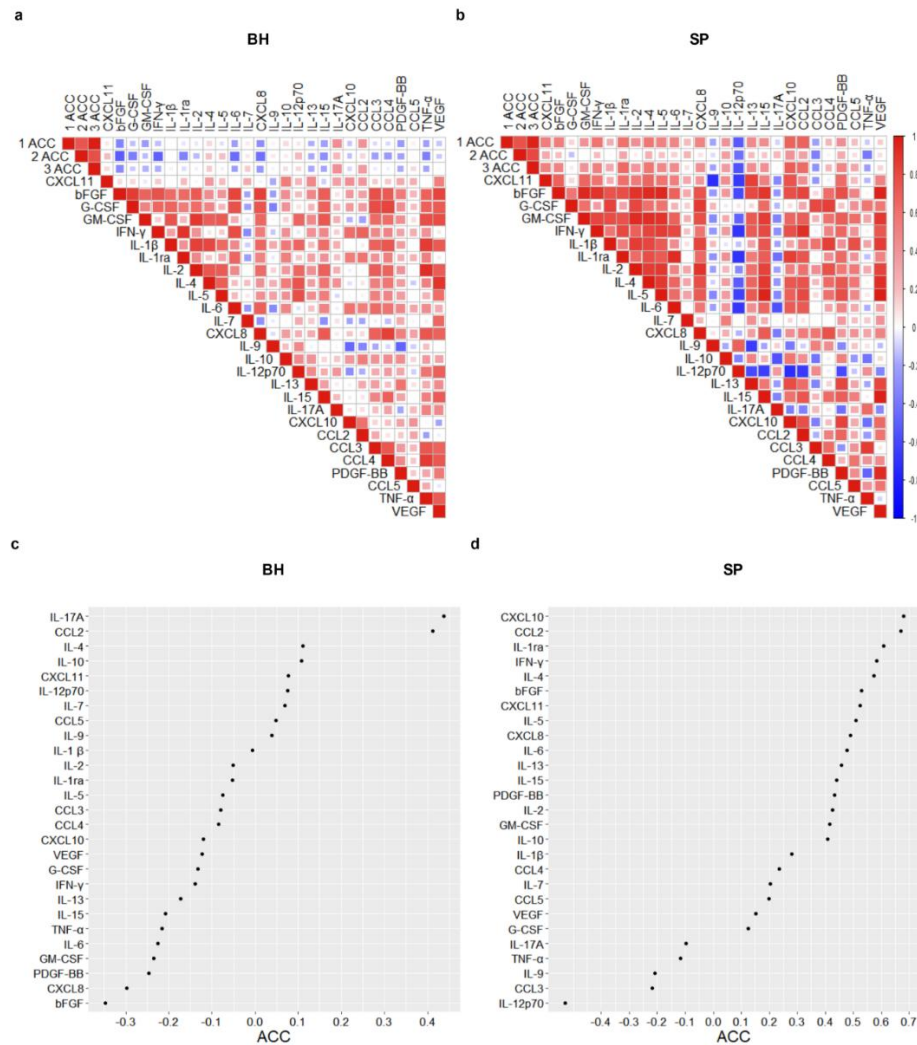


Figura 19- Indivíduos que residem em São Paulo (SP) apresentam diferentes correlações entre os mediadores inflamatórios e a aceleração do envelhecimento epigenético do que os indivíduos que residem em Belo Horizonte (BH).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre citocinas plasmáticas, quimiocinas e fatores de crescimento com a aceleração do envelhecimento biológico ($1ACC = skinHorvath$, $2ACC = PedBE$ e $3ACC = BLUP$) em indivíduos residentes em BH ($n = 10$) e (b) em SP ($n = 10$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre

a aceleração do envelhecimento biológico ($ACC = skinHorvath$) e a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento plasmáticos em indivíduos residentes em BH e (d) em SP ($n = 10$). A exibição apresenta correlações variando de -0,3 a 0,4 para BH e de -0,4 a 0,7 para SP. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos.

7.4 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência de Subtipos de Células NK

O envelhecimento está associado a diversas alterações no perfil das células NK (Brauning et al., 2022). Considerando que os indivíduos residentes em SP apresentaram envelhecimento epigenético acelerado em relação aos indivíduos residentes em BH e que cada coorte apresentou um perfil inflamatório distinto, nosso próximo passo foi investigar as frequências de diferentes subtipos de células NK identificando, por citometria de fluxo, as células NKT ($CD3^+ CD56^+$), NK citotóxicas ($CD3^- CD56^{Dim}$), NK produtoras de citocinas ($CD3^- CD56^{bright}$) e NK produtoras de quimiocinas ($CD3^- CD56^- CD16^{bright}$) com perfil de ativação ($NKG2D^+ CD69^+$), senescentes ($CD57^+$) e exaustas ($PD1^+$).

Nossos resultados mostraram que os indivíduos residentes em BH apresentaram uma maior frequência de células NKT (Fig. 20a), NK citotóxicas (Fig. 20b), NK produtoras de citocinas $NKG2D^+$ (Fig. 20c), NK citotóxicas $NKG2D^+$ (Fig. 20d) e NK citotóxicas $CD69^+$ (Fig. 20e), enquanto os indivíduos residentes em SP apresentaram uma maior frequência de células NK citotóxicas $CD57^+$ (Fig. 20f), NK citotóxicas $PD1^+$ (Fig. 20g), NK citotóxicas $PD1^+CD57^+$ (Fig. 20h) e NK produtoras de quimiocinas $CD57^+$ (Fig. 20i).

Ao compararmos as matrizes de correlação entre os fenótipos de células NK e a aceleração do envelhecimento, observamos que o correlograma dos indivíduos residentes em SP apresentou correlações positivas mais intensas entre os diferentes fenótipos do que o dos indivíduos residentes em BH (Fig. 21a, b). Além disso, a aceleração do envelhecimento dos indivíduos residentes em SP apresentou um maior número de correlações positivas, com os fenótipos de células NK que a dos indivíduos de BH (Fig. 21a-d).

O correlograma dos indivíduos residentes em BH indica que a aceleração do envelhecimento está correlacionada positivamente, em ordem crescente, com células NK produtoras de citocinas $NKG2D^+$, NK produtoras de citocinas $CD69^+$, NK produtoras de citocinas $CD57^+$, NKT, NK citotóxicas $CD69^+$, NK produtoras de quimiocinas $NKG2D^+$, NK citotóxicas $NKG2D^+$, NK produtoras de quimiocinas $CD57^+$ e NK produtoras de quimiocinas (Fig. 21c).

Por outro lado, o correlograma dos indivíduos residentes em SP mostra que a aceleração do envelhecimento está correlacionada positivamente, em ordem crescente, com as células NK produtoras de quimiocinas CD57+, NK produtoras de quimiocinas PD1+, NK citotóxicas CD57+, NKT, NK produtoras de quimiocinas CD57+ PD1+, NK citotóxicas NKG2D+, NK produtoras de citocinas CD69+, NK produtoras de quimiocinas NKG2D+, NK citotóxicas CD69+, NK produtoras de quimiocinas, NK produtoras de citocinas e NK produtoras de quimiocinas CD69+ (Fig. 21d).

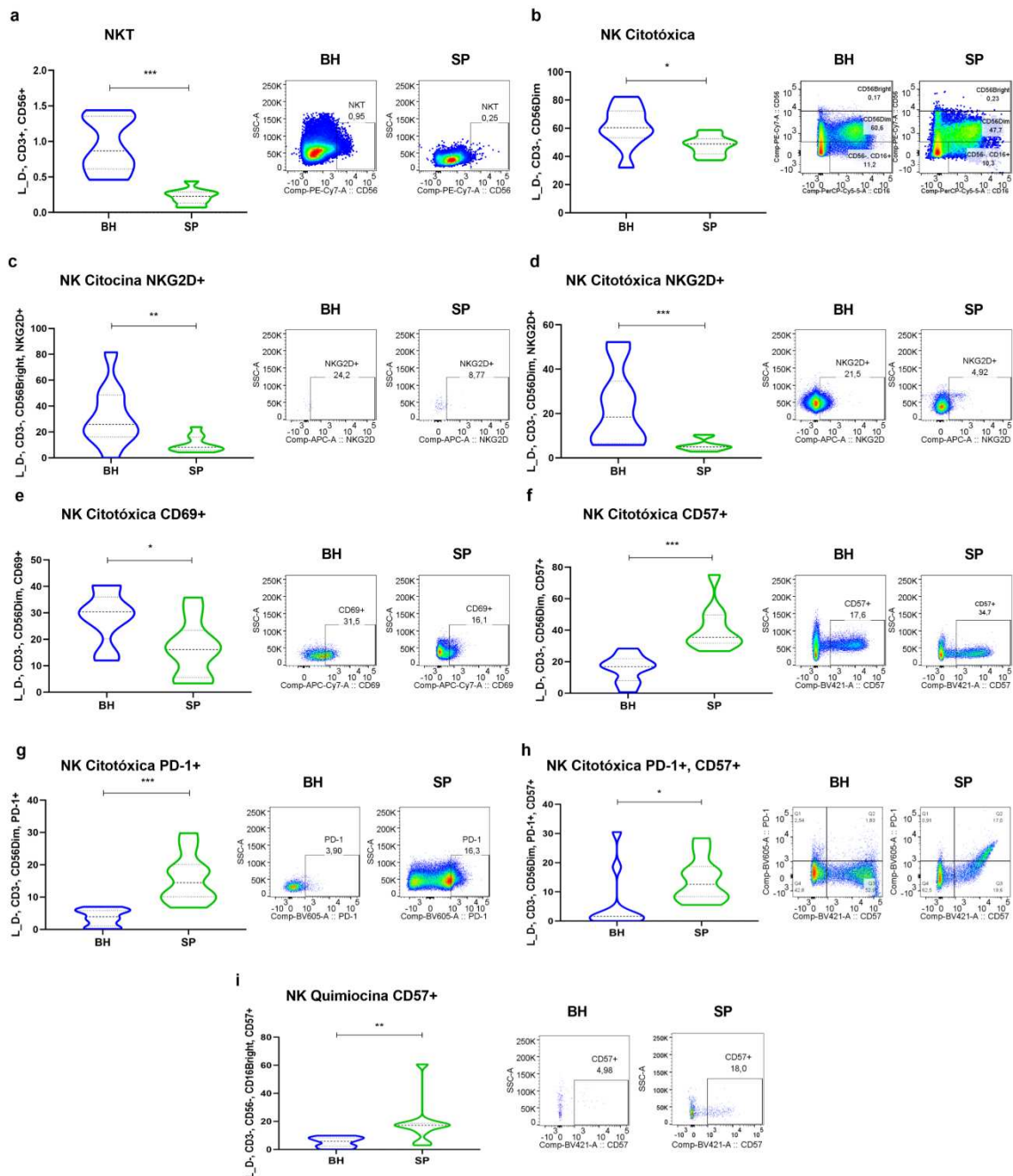


Figura 20 – Diferenças nas frequências de subtipos de células NK em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH). (a) Comparação dos subtipos de células NKT, (b) NK citotóxicas, (c) NK produtoras de citocinas NKG2D⁺, (d) NK citotóxicas NKG2D⁺, (e) NK citotóxicas CD69⁺, (f) NK citotóxicas CD57⁺, (g) NK citotóxicas PD1⁺, (h) NK citotóxicas PD1⁺CD57⁺ e (i) NK produtoras de quimiocinas CD57⁺. As comparações foram realizadas entre indivíduos residentes em Belo Horizonte (BH) (barras azuis, n = 8) e em São Paulo (SP) (barras verdes, n = 8). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de

Mann-Whitney, sendo consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)).

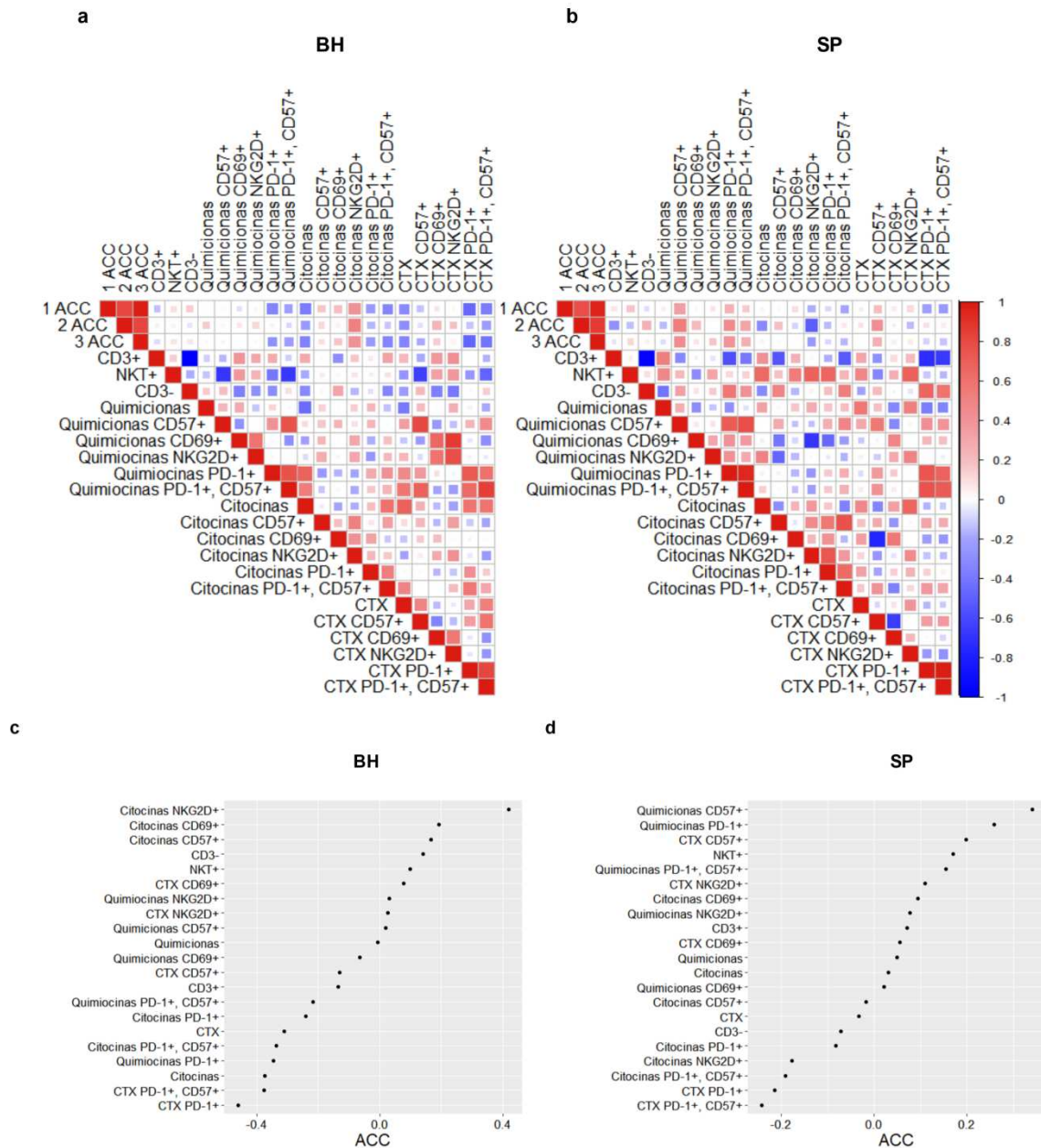


Figura 21 – Diferenças nas correlações entre os subtipos de células NK e envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre a imunofenotipagem de células NK e a aceleração do envelhecimento biológico ($1ACC = skinHorvath$, $2ACC = PedBE$ e $3ACC = BLUP$) em indivíduos residentes em BH ($n = 10$) e (b) em SP ($n = 10$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte

correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre a aceleração do envelhecimento biológico ($ACC = skinHorvath$) e a imunofenotipagem de células NK em indivíduos residentes em BH e (d) em SP ($n = 10$). A exibição apresenta correlações variando de -0,4 a 0,4 para BH e de -0,2 a 0,3 para SP. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos.

7.5 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência em Diferentes Subtipos de Linfócitos B

O envelhecimento também está associado a modificações no perfil dos linfócitos B (de Mol et al., 2021). Por esse motivo, investigamos as frequências de diferentes subtipos de células B identificados por citometria de fluxo. Comparamos os perfis das células secretoras de anticorpos (do inglês ASC) ($CD19+$, $CD27+$, $CD38^{high}$), dos plasmócitos imaturos ($CD19+$ $CD138+$) e dos linfócitos B-1a ($CD19+$ $CD5+$).

Também investigamos diferentes subtipos de linfócitos B de memória. Analisamos a frequência de linfócitos B de memória clássicos ($CD19+$ $CD27+$ $CD38-$), de linfócitos B de memória clássicos IgD- ($CD19+$ $CD27+$ $CD24+$ $CD38-$ $IgD-$) e de linfócitos B de memória clássicos IgD+ ($CD19+$ $CD27+$ $CD24+$ $CD38-$ $IgD+$), de linfócitos B de memória não clássicos ($CD19+$ $CD27-$ $CD24+$ $CD38^{low}$), de linfócitos B de memória maduros ($CD19+$ $CD27-$ $CD24-$ $CD38+/-$), de linfócitos B de memória maduros duplo negativos ($CD19+$ $CD27-$ $CD24$ $CD38+/-$ $IgD-$), de linfócitos B maduros de memória mais precoce ($CD19+$ $CD27-$ $CD24-$ $CD38+/-$ $IgD+$), de linfócitos B de memória transicionais T1/T2 ($CD19+$ $CD27-$ $CD24+$ $CD38^{high}$).

Nossos dados indicam que os indivíduos residentes em BH apresentam maior frequência de linfócitos B de memória não clássicos (Fig. 22a), enquanto os indivíduos residentes em SP apresentam maior frequência de ASCs (Fig. 22b), plasmócitos imaturos (Fig. 22c) e linfócitos B de memória maduros (Fig. 22d).

Ao compararmos as matrizes de correlação entre os fenótipos de linfócitos B e a aceleração do envelhecimento, observamos que os correlogramas revelaram que os indivíduos residentes em SP apresentaram correlações positivas mais intensas (Fig. 23a, b) e um número maior de correlações entre a aceleração do envelhecimento e os mediadores inflamatórios do que os residentes em BH (Fig. 23a-d).

A matriz de correlação dos residentes em BH mostrou que a aceleração do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem crescente, com linfócitos B de memória

não clássicos, plasmócitos imaturos, linfócitos B de memória clássicos IGD⁺ e linfócitos B maduros de memória precoce (Fig. 23c).

Já a matriz de correlação dos residentes em SP indicou que a aceleração do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem crescente, com linfócitos B de memória não clássicos, linfócitos B maduros de memória precoce, linfócitos B de memória maduros, linfócitos B de memória clássicos IGD⁺ e ASCs (Fig. 23d).

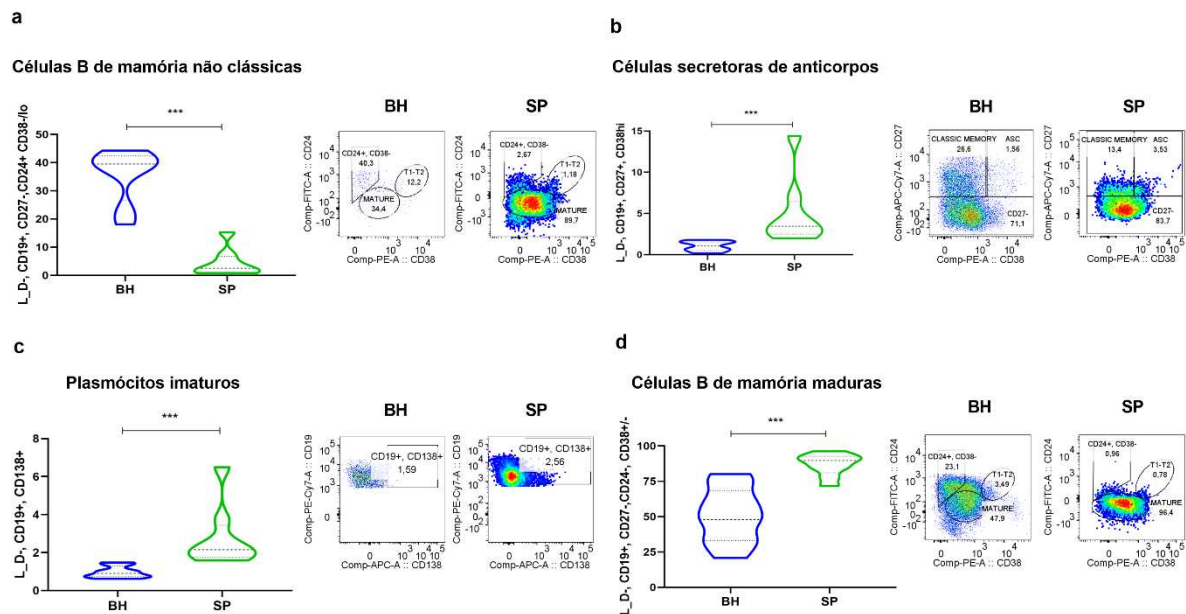


Figura 22 – Diferenças nas frequências dos diferentes subtipos de linfócitos B em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Comparação entre as frequências de linfócitos B não clássicos de memória, (b) células secretoras de anticorpos, (c) plasmócitos imaturos, (d) linfócitos B maduros de memória. As comparações foram realizadas entre indivíduos residentes em Belo Horizonte (BH) (barras azuis, $n = 8$) e em São Paulo (SP) (barras verdes, $n = 8$). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

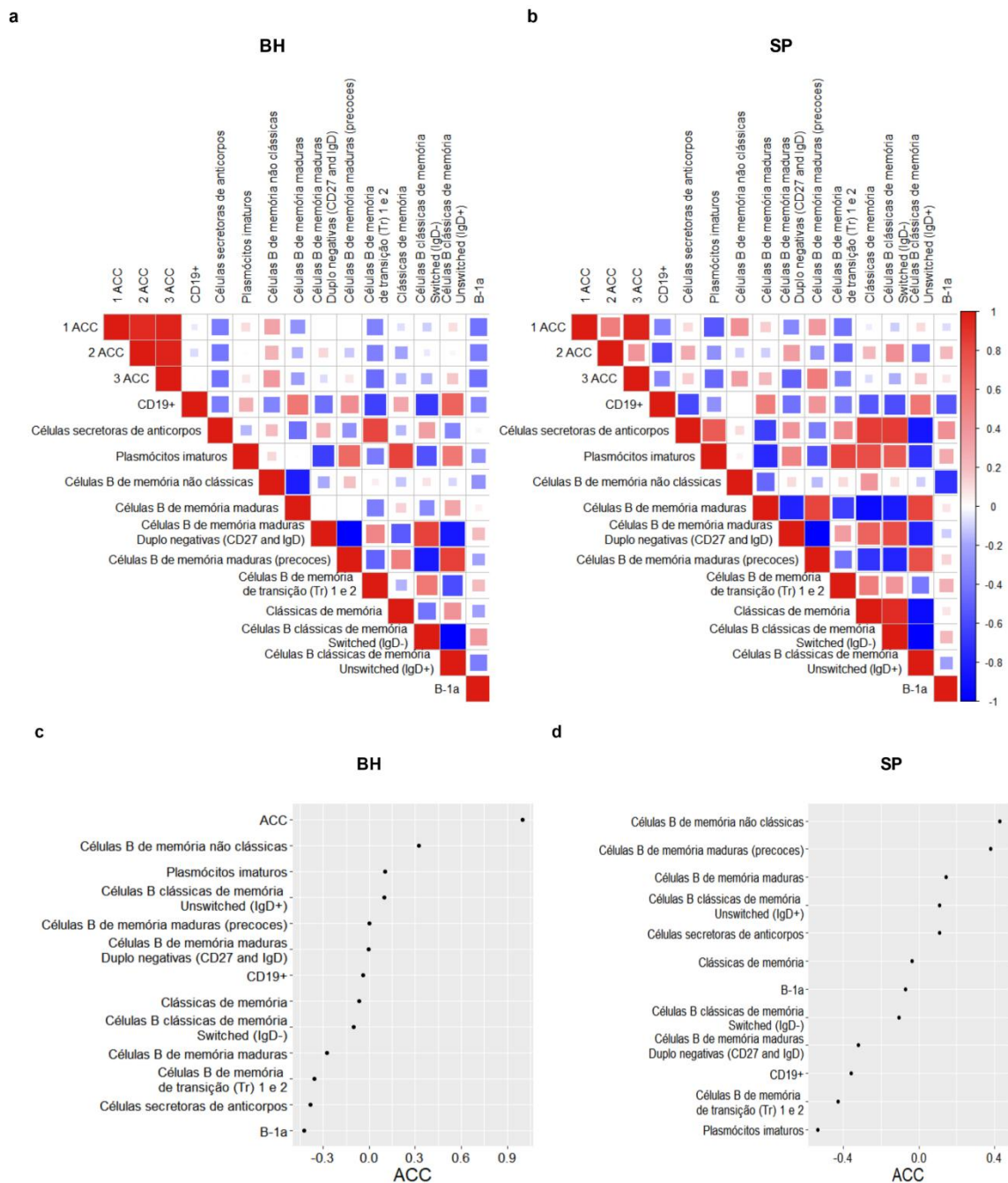


Figura 23– Diferenças nas correlações entre os subtipos de linfócitos B e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre os subtipos de linfócitos B e a aceleração do envelhecimento biológico ($1ACC = skinHorvath$, $2ACC = PedBE$ e $3ACC = BLUP$) em indivíduos residentes em BH ($n = 10$) e (b) em SP ($n = 10$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte

correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre a aceleração do envelhecimento biológico ($ACC = skinHorvath$) e as frequências de diferentes subtipos de linfócitos B em indivíduos residentes em BH e (d) em SP ($n = 10$). A exibição apresenta correlações variando de -0,4 a 0,3 para BH e de -0,4 a 0,4 para SP. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos.

7.6 Indivíduos Residentes em São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Frequência em Diferentes Subtipos de Linfócitos T

Além de estar relacionado a alterações nos perfis das células NK e dos linfócitos B, o envelhecimento também é amplamente associado a mudanças significativas nos linfócitos T (Mittelbrunn & Kroemer, 2021). Com base nisso, realizamos a análise das frequências de diferentes subtipos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ por citometria de fluxo com o objetivo de comparar os perfis de subpopulações específicas: linfócitos naïve ($CD45RO^- CCR7^+$), linfócitos efetores (EFF) ($CD45RO^- CCR7^-$), linfócitos de memória central (CM) ($CD45RO^+ CCR7^+$) e linfócitos de memória efetora (EM) ($CD45RO^+ CCR7^-$). Dentre essas subpopulações, foram considerados como células com perfil senescente aquelas que apresentavam perda da expressão de CD28 e/ou expressão de CD57 e/ou KLRG1; e como células com perfil exausto aquelas que expressavam PD-1 e/ou TIGIT.

Nossos dados indicam que os indivíduos residentes em BH apresentam maior frequência de linfócitos T $CD4^+$ EFF (Fig. 24a) e $CD4^+$ $CD28^-$ PD-1⁺ (Fig. 24b). Por outro lado, os indivíduos residentes em SP demonstram maior frequência de linfócitos T $CD4^+$ CM (Fig. 24c), $CD28^-$ $CD57^+$ (Fig. 24d), $CD28^-$ KLRG1⁺ (Fig. 24e), $CD28^-$ TIGIT⁺ (Fig. 24f), KLRG1⁺ (Fig. 24g) e TIGIT⁺ (Fig. 24h).

Adicionalmente, os resultados revelam que os indivíduos de BH apresentam maior frequência de linfócitos T $CD8^+$ naïve (Fig. 26a), KLRG1⁺ (Fig. 26b) e TIGIT⁺ (Fig. 26c). Em contrapartida, os residentes em SP exibem maior frequência de linfócitos T $CD8^+$ PD-1⁺ (Fig. 26d), $CD28^-$ $CD57^+$ (Fig. 26e), EM $CD28^-$ PD-1⁺ (Fig. 26f) EFF (Fig. 26g) e EFF PD-1⁺ (Fig. 26h).

Ao compararmos as matrizes de correlação entre os fenótipos de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ e a aceleração do envelhecimento, observamos que a intensidade e o número de correlações são muito semelhantes entre as duas cidades (Fig. 25a, d, Fig. 27 a, d). A matriz de correlação dos linfócitos T $CD4^+$ dos residentes de BH mostrou que a aceleração

do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem decrescente, com CD28-KLG1+, TIGIT+PD1+CD57+, CD28-CD57+, EMCD28-, KLG1+, CD57+, CD28-CD57+KLG1+, CD28-, KLG1+ PD1+, PD1+, CD57+PD1+, Naive, CD28-PD1+, CD4+ e CD28-ICOS+ (Fig. 25c).

A matriz de correlação dos linfócitos T CD4+ dos residentes em SP indicou que a aceleração do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem decrescente, com CD28-PD1+, CD28-CD57+, CD4+, CD57+, CD57+PD1+, CM, CD28-, TIGIT+PD1+CD57+, EMCD28-, CD28-CD57+KLG1+, KLG1+PD1+, CD28-PD1+, PD1+, Naive e CD28-KLG1+ (Fig. 25d).

A matriz de correlação dos linfócitos T CD8+ dos residentes de BH mostrou que a aceleração do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem decrescente, com PD1+KLG1+, CD57+, EM CD28-, EFF CD28-PD1+, KLG1+, CD28-KLG1+, EFF, CD28-, CD28-CD57+, CM, CD57+PD1+, TIGIT+ICOS+, EFF PD1+, EFF CD28-KLG1+, EMCD28-PD1+, CD28-PD1+, EffCD28-CD57+ (Fig. 27c).

A matriz de correlação dos linfócitos T CD8+ dos residentes de SP indicou que a aceleração do envelhecimento biológico apresentou correlações positivas, em ordem decrescente, com EFF CD28-PD1+, EFF CD28-CD57+, EFFCD28- KLG1+, EM, CD28- KLG1+, KLG1+, CD57+, CD57+ PD1+, CD28- CD57+, TIGIT+, EFF, CM, CD28- ICOS+, Naive, PD1+ KLG1+ e CD28- KLG1+ (Fig. 27d).

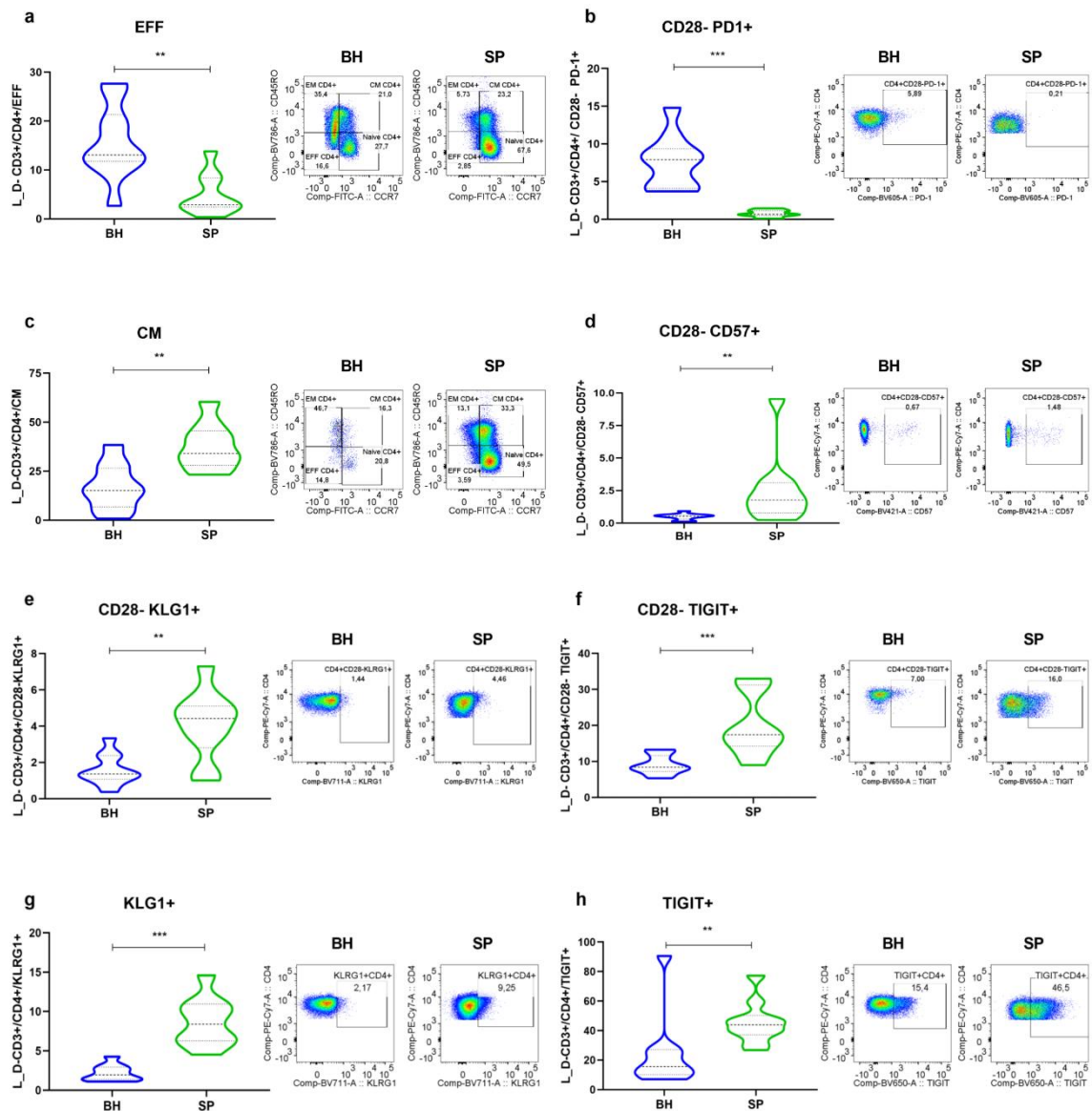


Figura 24 – Diferenças nas frequências de subtipos de linfócitos T CD4+ em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Comparação das frequências de subtipos de linfócitos T CD4+ efetores, (b) linfócitos T CD4+ CD28-PD1+, (c) linfócitos T CD4+ de memória central, (d) linfócitos T CD4+ CD28-CD57+, (e) linfócitos T CD4+ CD28-KLG1+, (f) linfócitos T CD4+ CD28-TIGIT+, (g) linfócitos T CD4+ KLG1+ e (h) linfócitos T CD4+ TIGIT+. As comparações foram realizadas entre indivíduos residentes em Belo Horizonte (BH) (barras azuis, $n = 10$) e em São Paulo (SP) (barras verdes, $n = 10$). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

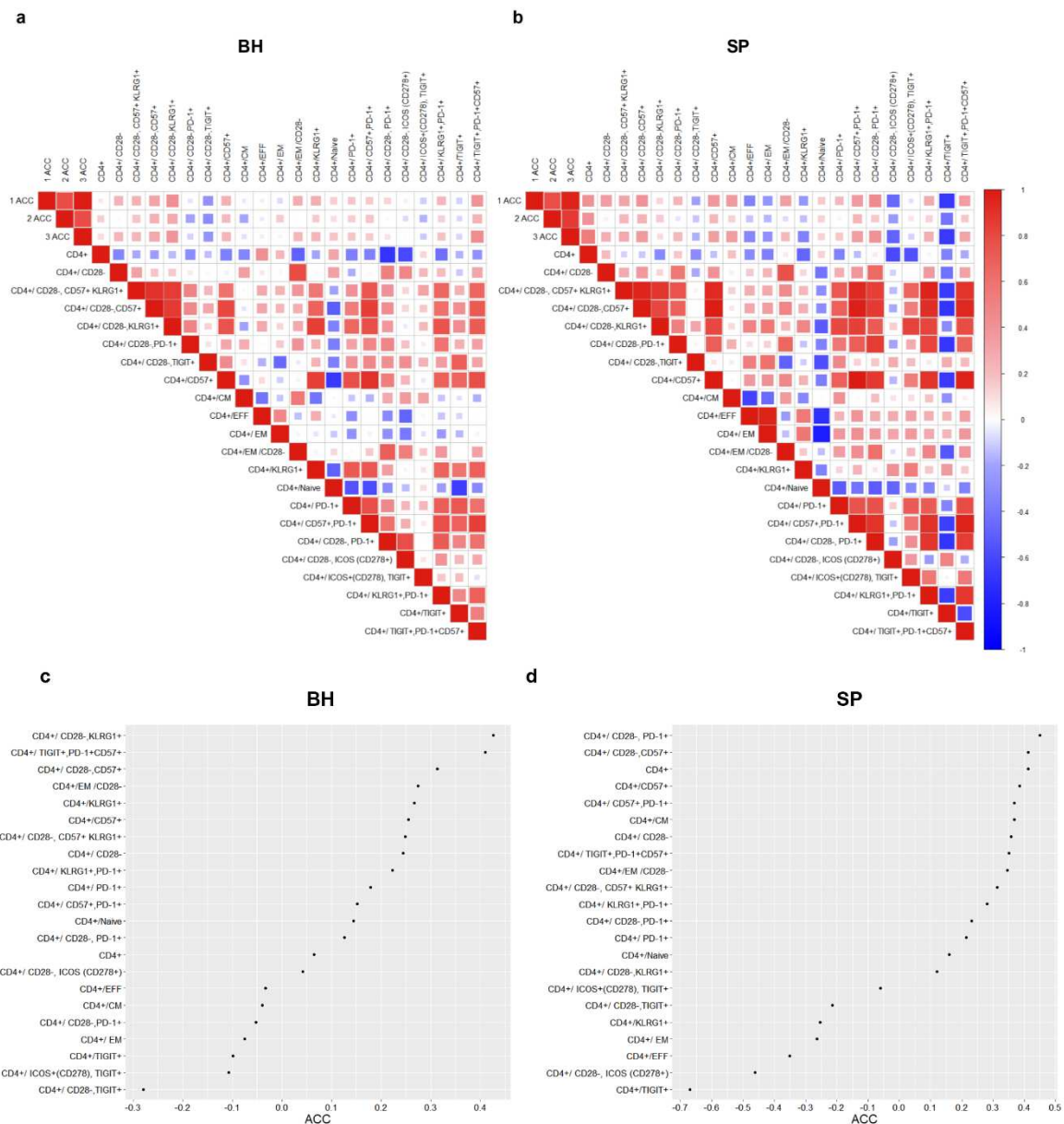


Figura 25– Diferenças nas correlações de subtipos de linfócitos T CD4+ e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre a imunofenotipagem de células TCD4+ e a aceleração do envelhecimento biológico ($1ACC = skinHorvath$, $2ACC = PedBE$ e $3ACC = BLUP$) em indivíduos residentes em BH ($n = 10$) e (b) em SP ($n = 10$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre a aceleração do envelhecimento biológico ($ACC = skinHorvath$) e as frequências de subtipos de linfócitos TCD4+ em indivíduos residentes em BH e (d) em SP ($n = 10$). A exibição apresenta correlações

variando de -0,3 a 0,4 para BH e de -0,7 a 0,5 para SP. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos.

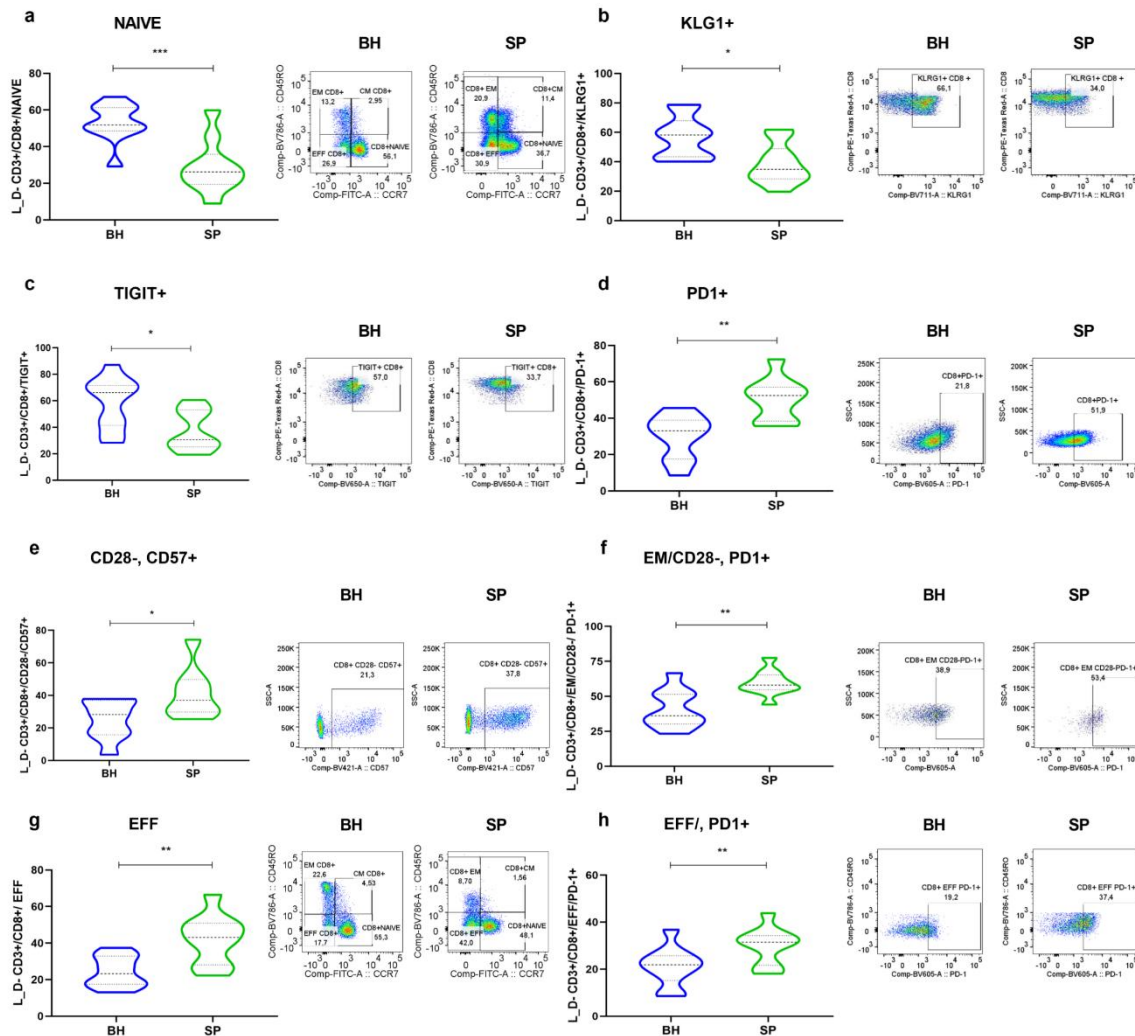


Figura 26– Diferenças nas frequências de subtipos de linfócitos T CD8+ em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Comparação da imunofenotipagem de linfócitos T CD8+ naive, (b) linfócitos TCD8+ KLG1+, (c) linfócitos TCD8+ TIGIT+, (d) linfócitos TCD8+ PD1+, (e) linfócitos TCD8+ CD28- CD57+, (f) linfócitos TCD8+ de memória efetores CD28-PD1+, (g) linfócitos TCD8+ efetores, (h) linfócitos TCD8+ efetores PD1+. As comparações foram realizadas entre indivíduos residentes em Belo Horizonte (BH) (barras azuis, $n = 10$) e em São Paulo (SP) (barras verdes, $n = 10$). As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

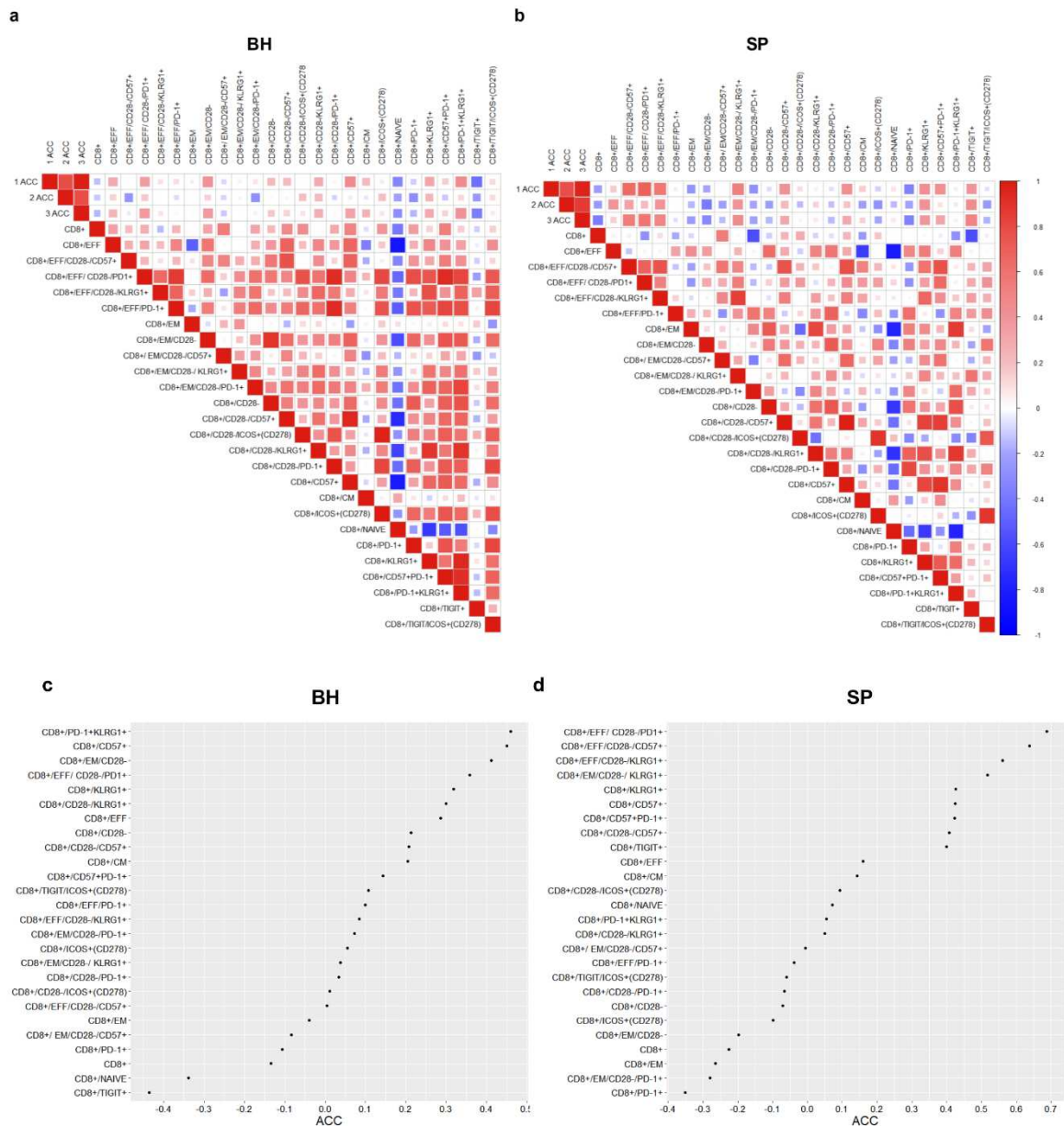


Figura 27 – Diferenças nas correlações entre os subtipos de linfócitos T CD8+ e o envelhecimento epigenético em indivíduos residentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH).

(a) Correlogramas de Spearman representando a correlação entre a imunofenotipagem de células TCD8+ e a aceleração do envelhecimento biológico ($1ACC = skinHorvath$, $2ACC = PedBE$ e $3ACC = BLUP$) em indivíduos residentes em BH ($n = 10$) e (b) em SP ($n = 10$). A intensidade da correlação entre duas variáveis é representada pela cor do quadrado em sua intersecção, variando de vermelho brilhante (forte correlação positiva; $r^2 = 1,0$) a azul brilhante (forte correlação negativa; $r^2 = -1,0$). (c) Correlograma de Spearman entre a aceleração do

envelhecimento biológico ($ACC = skinHorvath$) e a imunofenotipagem de células TCD8⁺ em indivíduos residentes em BH e (d) em SP (n = 10). A exibição apresenta correlações variando de -0,4 a 0,5 para BH e de -0,4 a 0,7 para SP. Os dados representam valores de $p \leq 0,05$ na análise estatística realizada entre os grupos.

7.7 São Paulo e Belo Horizonte Apresentam Diferenças na Emissão de Poluentes

Nossas análises epigenéticas demonstraram que os indivíduos residentes em SP apresentaram envelhecimento epigenético acelerado (Fig. 17a–f), além de um perfil de linfócito B mais maduros (Fig. 22b-d) e células NK (Fig. 20f-i) e linfócitos T (Fig. 24c-h) (Fig. 25d-f, h-i) mais senescentes e exaustos, em comparação com aqueles que vivem em BH. Nossa hipótese explicativa para esses resultados é que as diferenças na exposição a antígenos entre os indivíduos das duas cidades, decorrentes de variações geográficas, demográficas e de organização urbana, possam estar associadas aos distintos ritmos de envelhecimento. Como os indivíduos de SP apresentaram maior produção de citocinas como IL-4 (Fig. 18f) e IL-5 (Fig. 18g), bem como uma maior frequência de altos produtores de IL-9, IL-5 e IL-4 (Fig. 18l), características da polarização da resposta imune do tipo 2 associada a doenças alérgicas, decidimos avaliar as diferenças na emissão de poluentes entre as duas cidades utilizando dados públicos disponibilizados pela Plataforma da Qualidade do Ar do Instituto de Energia e Meio Ambiente (IEMA). Nossos resultados mostraram que a cidade de SP apresentou maiores emissões de PM₁₀ (Fig. 28a), PM_{2.5} (Fig. 28b), CO (Fig. 28c) e NO₂ (Fig. 28d), BH apresentou maiores emissões de O₃ (Fig. 28e) e SO₂ (Fig. 28f), no período de 2015 a 2019, que antecedeu a coleta das amostras dos nossos voluntários.

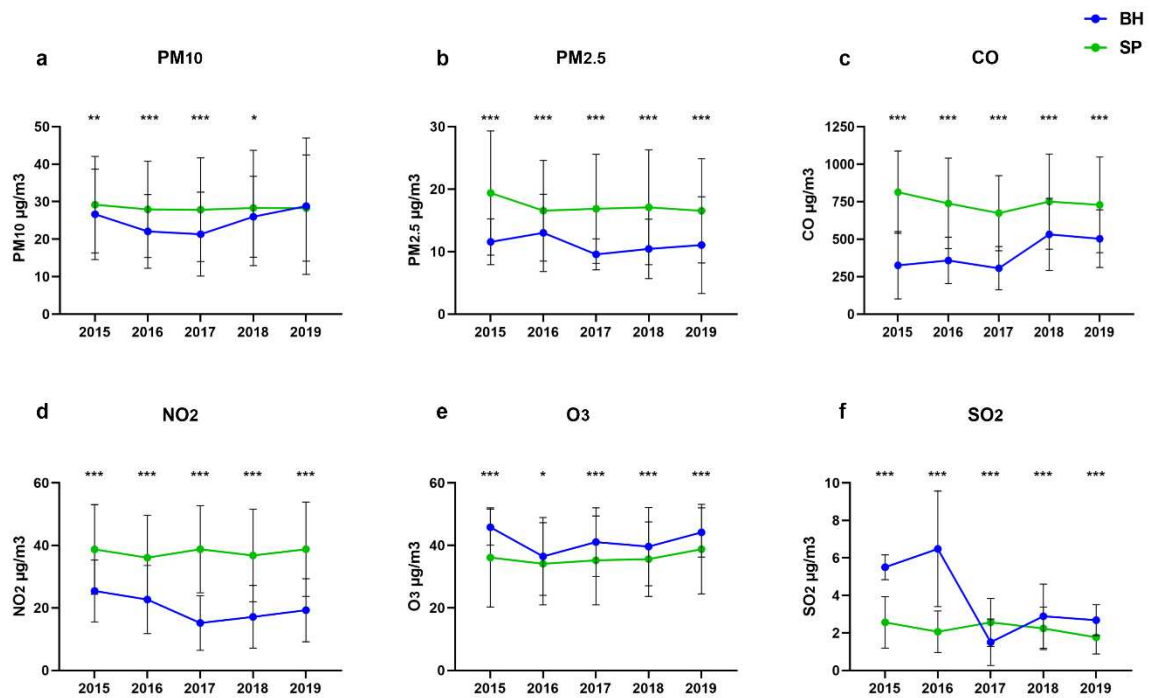


Figura 28 – Diferenças na emissão de poluentes em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.

(a) Comparação da emissão média de PM₁₀ (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. (b) Comparação da emissão média de PM_{2.5} (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. (c) Comparação da emissão média de CO (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. (d) Comparação da emissão média de NO₂ (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. (e) Comparação da emissão média de O₃ (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. (f) Comparação da emissão média de SO₂ (µg/m³) em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde) no período de 2015 a 2019. Foi realizado o teste t não pareado. As diferenças estatísticas foram indicadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)

7.8 Diferenças nas Hospitalizações por Doenças do Sistema Respiratório, Infecções e Doenças Parasitárias entre Residentes de São Paulo e Belo Horizonte

Para avaliar os possíveis efeitos da maior emissão de PM₁₀, PM_{2.5}, CO e NO₂ (Fig. 28a-d), que encontramos na cidade de SP no período de 2015 a 2019, nós comparamos as hospitalizações por doenças do sistema respiratório por 100.000 habitantes, segundo os registros do

Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) no mesmo período. Nossas análises mostraram que SP registrou um número mais elevado de hospitalizações por doenças do sistema respiratório que BH nesse período (Fig. 29a). Como observamos uma polarização da resposta imune do tipo 2 nos indivíduos de SP (Fig. 18f–g, l), que, além de estar associada a doenças alérgicas (Ogulur et al., 2025), também se associa a doenças parasitárias (Romagnani, 1996b), avaliamos ainda o número de hospitalizações por infecções e doenças parasitárias por 100.000 habitantes, no mesmo período, utilizando o mesmo banco de dados. Nossos resultados indicaram que SP registrou um número maior de hospitalizações por essas condições (Figs. 29 e 30).

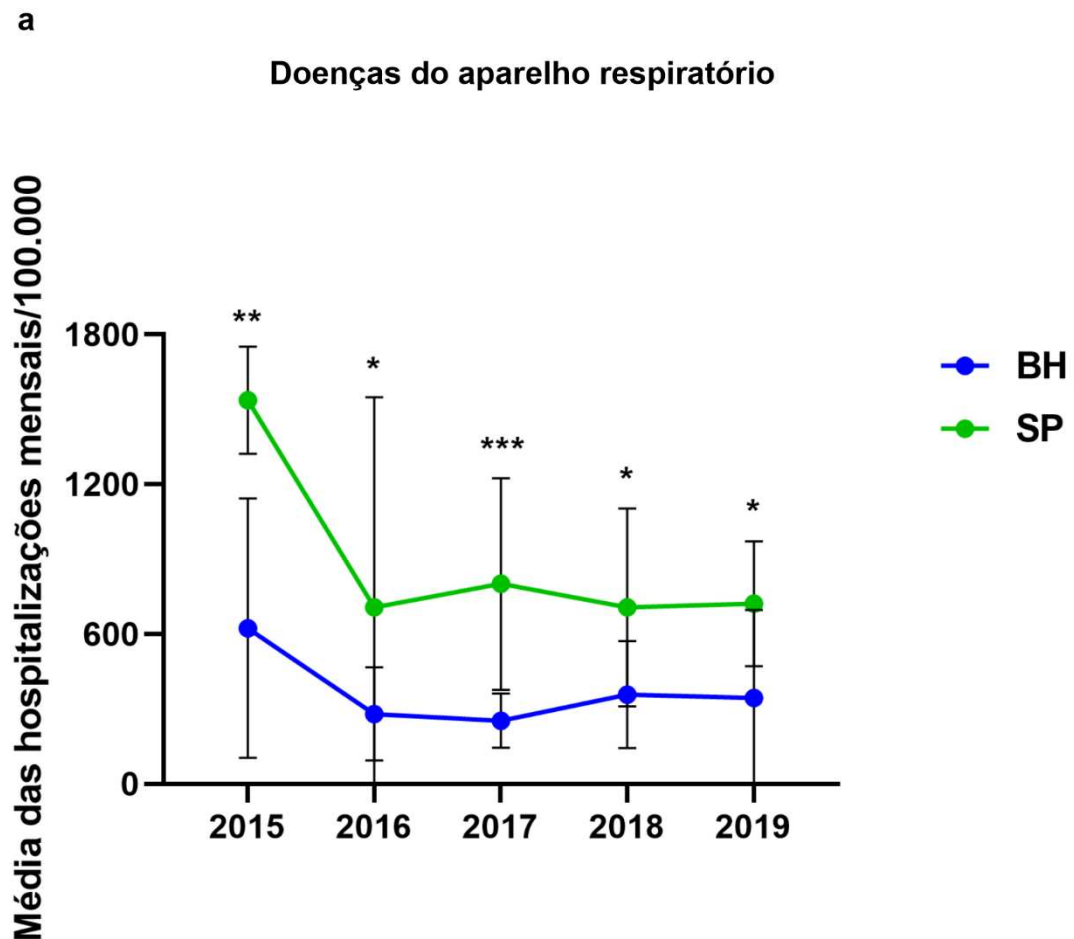


Figura 29– Diferenças nas hospitalizações por doenças do sistema respiratório em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.

Comparação no número de hospitalizações por 100.000 habitantes devido a doenças do sistema respiratório em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde), no período de 2015 a

2019. Foi realizado o teste t não pareado. As diferenças estatísticas foram indicadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)).

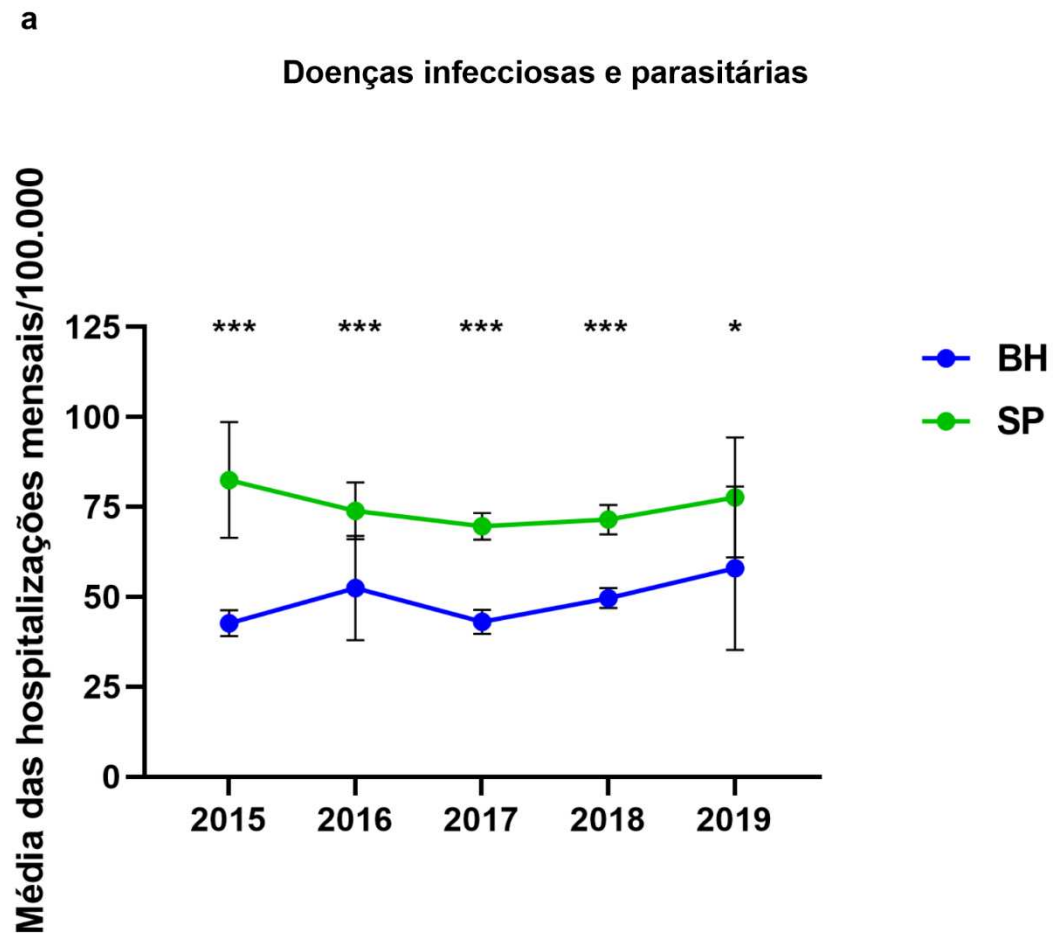


Figura 30 – Diferenças nas hospitalizações por infecções e doenças parasitárias em São Paulo (SP) e Belo Horizonte (BH), no período de 2015 a 2019.

Comparação no número de hospitalizações por 100.000 habitantes devido a infecções e doenças parasitárias em Belo Horizonte (linha azul) e São Paulo (linha verde), no período de 2015 a 2019. Foi realizado o teste t não pareado. As diferenças estatísticas foram indicadas por $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), e $p \leq 0,001$ (***)).

8. DISCUSSÃO CAPÍTULO 2

Ao longo da vida, os indivíduos estão continuamente expostos a uma ampla gama de antígenos, incluindo microrganismos, parasitas, nutrientes, componentes celulares e metabólitos, provenientes do ambiente e do próprio organismo, desempenhando papel central na formação e modulação do sistema imunológico. Nesse contexto, a teoria da imunobiografia, proposta por Franceschi (2017), permite compreender como as exposições antigênicas, considerando tipo, dose, frequência e sequência temporal, moldam os perfis imunológicos e influenciam o processo de envelhecimento (Franceschi, 2017). Além disso, estudos anteriores vêm demonstrando que fatores geográficos associados ao padrão de vida e aos indicadores socioeconômicos exercem impacto sobre o envelhecimento humano, especialmente quando analisado sob a perspectiva do envelhecimento biológico (Yusipov et al., 2024; Hernandez et al., 2024). No entanto, essas investigações têm sido conduzidas majoritariamente em coortes de países desenvolvidos, com foco em populações predominantemente caucasianas e em fatores ambientais característicos desses contextos, limitando a extrapolação dos achados para realidades marcadas por maior heterogeneidade social e epidemiológica.

No presente estudo, contribuindo de forma inédita na investigação do envelhecimento biológico em um contexto urbano latino-americano, observa-se que, conforme apresentado na Tabela 6, embora Belo Horizonte (BH) e São Paulo (SP) apresentem elevados Índices de Desenvolvimento Humano Municipal (IDH-M), os indicadores de BH sugerem um perfil social e assistencial ligeiramente mais favorável. Esse cenário inclui expectativa de vida mais alta, menor desigualdade de renda, medida pelo Índice de Gini, e maior cobertura da Estratégia Saúde da Família (ESF). Adicionalmente, BH apresenta menor tempo médio de espera para atendimentos no Sistema Único de Saúde (SUS), o que é consistente com maior eficiência dos serviços públicos de saúde. Por outro lado, SP apresenta maior densidade de médicos, porém com distribuição espacial mais desigual, refletida por um Índice de Concentração (IC) elevado, o que sugere acesso heterogêneo aos serviços de saúde dentro do próprio município.

Esse cenário é agravado por indicadores preocupantes observados nas periferias de ambas as cidades, como a elevada taxa de mortalidade infantil e a razão de mortalidade materna, especialmente entre mulheres negras. A diferença expressiva na expectativa de vida entre bairros de maior e menor renda, que alcança aproximadamente 15 anos em Belo Horizonte e 14 anos em São Paulo, reforça que os determinantes sociais influenciam de forma desigual a

saúde das populações, evidenciando a coexistência de múltiplas realidades epidemiológicas no Brasil (Tabela 6).

Em decorrência dessas desigualdades estruturais, particularmente relacionadas ao acesso aos serviços de saúde, à qualidade de vida e à exposição ambiental, o ritmo de envelhecimento biológico pode variar entre indivíduos e populações, uma vez que o ambiente pode induzir alterações epigenéticas que modulam a expressão gênica. Nesse contexto, os relógios epigenéticos representam uma ferramenta amplamente utilizada para essa mensuração, com base em padrões de metilação do DNA, permitindo estimar a idade biológica relativa da coorte estudada e identificar aceleração ou desaceleração do envelhecimento, sem que isso represente, necessariamente, rejuvenescimento biológico (Field et al., 2018).

Indivíduos com aceleração do envelhecimento igual a zero não alteram a média da coorte, embora estejam incluídos nas análises, e é importante destacar que tanto jovens quanto idosos podem ou não apresentar aceleração do envelhecimento, o que é consistente com a influência de múltiplos fatores contextuais e comportamentais, como estilo de vida e exposições ambientais.

Partindo da hipótese de que diferenças geográficas possam refletir exposições antigênicas distintas e, conseqüentemente, trajetórias divergentes de envelhecimento biológico, neste capítulo comparamos a aceleração do envelhecimento de indivíduos residentes em BH e SP. Para isso, utilizamos os relógios epigenéticos em nossas análises.

Nossas análises indicaram que os indivíduos residentes em SP apresentam maior aceleração do envelhecimento biológico nos seis relógios avaliados, em comparação aos residentes em BH (Fig. 17a–f). Esse achado sugere que os residentes dessas duas cidades seguem trajetórias distintas de envelhecimento, possivelmente moduladas por fatores ambientais.

Embora fatores individuais relacionados ao estilo de vida, como alimentação, qualidade do sono e prática de atividade física, influenciem diretamente a saúde e os processos de envelhecimento, é fundamental reconhecer a influência de determinantes ambientais de natureza coletiva, como a poluição do ar, a contaminação da água e dos alimentos, bem como a exposição a doenças infecciosas (Hernandez et al., 2025). Esses fatores dependem, em grande medida, da formulação e da implementação de políticas públicas, o que reforça que o envelhecimento biológico não pode ser interpretado exclusivamente como resultado de escolhas individuais (Hernandez et al., 2025). Além disso, esses determinantes ambientais individuais e coletivos refletem desigualdades sociais estruturais, frequentemente invisibilizadas quando interpretadas

apenas como resultado do comportamento pessoal. Com o objetivo de minimizar a influência de variáveis individuais, os voluntários incluídos nessas análises foram rigorosamente pareados quanto ao sexo, à idade e à presença de comorbidades (Tabela 2).

Um estudo recente de Yusipov e colaboradores demonstrou diferenças no envelhecimento biológico, avaliadas por meio de relógios epigenéticos, associadas a aspectos geográficos e socioeconômicos em 25 países. Embora o estudo apresente limitações metodológicas relevantes, decorrentes do uso de bancos de dados públicos, seus achados estão alinhados com a hipótese de que o contexto geográfico e social influencia o envelhecimento humano, apoiando a interpretação dos resultados observados na nossa coorte (Yusipov et al., 2024).

Dessa forma, nossos dados sugerem que as diferenças ambientais e sociais entre BH e SP são consistentes com o envelhecimento biológico mais acelerado observado nos indivíduos residentes em SP, quando comparados aos de BH. No mesmo sentido, dados referentes à expectativa de vida indicam que os moradores de BH vivem, em média, 77 anos, enquanto os moradores de SP apresentam uma média de vida de aproximadamente 76 anos. Contudo, observa-se grande variabilidade intraurbana, especialmente em SP, o que reforça o papel das desigualdades sociais na determinação da saúde ao longo da vida (Tabela 6).

Considerando que as variações nas exposições antigênicas observadas entre os diferentes contextos (Tabela 6) e as diferenças no ritmo de envelhecimento identificadas em nossos resultados (Fig. 17a–f) podem estar associadas a alterações no perfil inflamatório (Ajoalabady et al., 2024), mensuramos, em nossa coorte, a produção de 27 mediadores inflamatórios, com o objetivo de identificar padrões relacionados ao envelhecimento biológico entre os residentes das duas cidades.

Nossos dados indicaram que os indivíduos residentes em BH apresentaram maior produção de IL-6 (Fig. 18a), IL-1 β (Fig. 18b), IL-1ra (Fig. 18c), TNF- α (Fig. 18d) e IL-10 (Fig. 18e). Estudos demonstram que células imunes inatas, como monócitos e macrófagos residentes em tecidos, são importantes fontes dessas citocinas (Wang et al., 2024). A IL-1 β pode atuar tanto no meio extracelular quanto intracelularmente, promovendo a ativação de outras interleucinas inflamatórias, como a IL-6, que, por sua vez, pode induzir senescência parácrina e modular respostas imunes (Wang et al., 2024). Embora níveis elevados de IL-6 e TNF- α estejam associados a doenças relacionadas à idade, como doença de Alzheimer e fragilidade (Fabbri et al., 2015), nossos achados sugerem que esse perfil inflamatório em BH, ocorre de forma dissociada da aceleração do envelhecimento biológico. Diferentemente de uma interpretação

centrada exclusivamente na senescência celular, a maior produção das interleucinas IL-6 (Fig. 18a), IL-1 β (Fig. 18b), e o TNF- α (Fig. 18d), que estão entre os principais componentes do fenótipo secretor associado à senescência (SASP), parece ser refletir um estado de inflamação, contrabalanceado por respostas regulatórias como IL-1ra (Fig. 18c) e IL-10 (Fig. 18e).

Nesse contexto, a maior produção de IL-10, uma citocina com propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras associada ao envelhecimento bem-sucedido (Lukyanova et al., 2024; Li et al., 2024), juntamente com o aumento de IL-1ra, antagonista do receptor de IL-1, é consistente com a ativação de mecanismos compensatórios de regulação inflamatória. Esse padrão sugere a coexistência de estímulos pró-inflamatórios e mecanismos ativos de contenção da inflamação, apoiando a hipótese de que o envelhecimento em BH esteja associado a um processo de remodelamento imunológico.

O remodelamento imunológico pode ser compreendido como uma estratégia adaptativa frente à perda progressiva de funções efetoras. Indivíduos capazes de ativar mecanismos mais eficientes de remodelamento tendem a atenuar os efeitos deletérios da imunossenescência, processo frequentemente associado ao envelhecimento saudável em populações longevas (Caruso et al., 2022; Lima-Silva et al., 2024).

Por outro lado, os indivíduos residentes em SP apresentaram maior produção de IL-4 (Fig. 18f), IL-5 (Fig. 18g), IL-15 (Fig. 18h), CCL3 (Fig. 18i) e G-CSF (Fig. 18j), configurando um perfil inflamatório predominantemente associado à polarização da resposta imune do tipo Th2. Citocinas como IL-4 e IL-5 são características desse perfil e estão associadas tanto a doenças alérgicas quanto a infecções parasitárias (Ogulur et al., 2025; Romagnani, 1996).

Em concordância com nossos dados, que indicam que, em SP, a predominância de um perfil Th2 associa-se à aceleração do envelhecimento epigenético, evidências prévias demonstram que a produção de IL-4 e IL-5 tende a aumentar com o avanço da idade (Candore et al., 1993; Hobbs et al., 1993; Caruso, 1996; Castle, 1997; Jing et al., 2007). Nesse mesmo sentido, a maior produção de CCL3, um componente associado ao SASP (Suryadevara et al., 2024), tem sido relacionada ao desenvolvimento de asma brônquica, frequentemente em associação com IL-5 (Tillie-Leblond et al., 2000; Manni et al., 2014), contribuindo para um ambiente inflamatório compatível com esse perfil. Adicionalmente, a elevação do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), embora possa favorecer a sobrevivência e a quimiotaxia de neutrófilos (Brach et al., 1992; Wolach et al., 2007), mostrou-se, neste estudo, associada a um perfil inflamatório menos regulado, compatível com a aceleração do envelhecimento biológico.

No entanto, o aumento da IL-15 circulante, descrito em indivíduos longevos saudáveis (Gangemi et al., 2005), apresenta efeitos benéficos sobre a massa muscular e a composição corporal (Quinn, 2002; Quinn, 2009), mas também estimula a proliferação de células T de memória, cujo acúmulo é característico da imunossenescência (De Martinis et al., 2005). Dessa forma, os níveis elevados de IL-15 observados em SP podem estar associados a um mecanismo distinto de remodelamento imunológico.

A análise integrada dos mediadores inflamatórios por meio de gráficos radar revelou que, embora os indivíduos residentes em BH apresentem maior frequência de altos produtores de citocinas associadas ao SASP, eles exibem um perfil inflamatório mais homogêneo e equilibrado (Fig. 18k). Por sua vez, os indivíduos residentes em SP apresentaram um perfil mais heterogêneo, caracterizado por maior frequência de altos produtores de citocinas associadas ao eixo Th2 (Fig. 18l).

Essa resposta imune do tipo Th2, observada nos residentes de SP, é biologicamente compatível com um contexto ambiental caracterizado por elevados níveis de poluição atmosférica (Zhou et al., 2024), o que pode estar associado a maior incidência de doenças respiratórias inflamatórias. Evidências experimentais e epidemiológicas indicam que exposições ambientais específicas, como o material particulado fino (PM_{2,5}), o carbono negro e o monóxido de carbono, podem modular diretamente a produção de mediadores inflamatórios, influenciando tanto respostas pró-inflamatórias quanto regulatórias. Estudos de exposição individual demonstraram que aumentos agudos de PM_{2,5} e CO estão associados ao aumento da produção de quimiocinas como CXCL10 e CCL5, enquanto a exposição ao carbono negro pode reduzir a produção de CCL5 e TNF- α (Raqib et al., 2022). Essas associações devem ser interpretadas como convergências biológicas entre exposições ambientais e perfis imunológicos, e não como evidência de causalidade direta em nível individual.

De Oliveira Fernandes e colaboradores (2020) demonstraram que a cidade de SP lidera o número de excedências aos padrões finais de qualidade do ar, com destaque para a emissão de material particulado fino (PM_{2,5}), que apresentou a maior média anual, de 16,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ em 2018, e excedeu os padrões finais nos anos de 2016 a 2018 (De Oliveira Fernandes et al., 2020). Além disso, de Toledo e Nardocci demonstraram, em uma revisão bibliográfica, que diversos estudos relacionam a poluição do ar na cidade de SP a problemas respiratórios, aumento da mortalidade e hospitalizações, entre outros efeitos, particularmente em idosos e crianças (de Toledo & Nardocci, 2011). Corroborando esses achados, estudos experimentais indicam que a exposição ao PM_{2,5} está associada à lesão endotelial, evidenciada pelo aumento de micropartículas

endoteliais apoptóticas, acompanhada por elevação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β , e de moléculas de adesão endotelial (Pope et al., 2016).

Com o objetivo de investigar a relação entre os mediadores inflamatórios e a aceleração do envelhecimento epigenético, realizamos análises de matrizes de correlação. Os correlogramas indicaram que os indivíduos residentes em SP apresentaram maior número e maior intensidade de correlações positivas entre mediadores inflamatórios e envelhecimento epigenético, quando comparados aos residentes de BH (Fig. 19a–b).

Especificamente, entre os residentes de BH, a aceleração do envelhecimento epigenético apresentou correlações positivas com um conjunto restrito de citocinas (Fig. 19c). Já entre os residentes de SP, a idade epigenética se correlacionou positivamente com um amplo espectro de mediadores inflamatórios, incluindo as citocinas associadas ao perfil Th2 e inflamatório (Fig. 19d). Nossos achados indicam que, com exceção da IL-10, as citocinas elevadas em BH não apresentaram correlação significativa com a aceleração do envelhecimento biológico, enquanto, em SP, a maior produção de IL-4, IL-5, IL-15 e G-CSF mostrou-se associada ao envelhecimento, reforçando a existência de perfis inflamatórios distintos e trajetórias divergentes de envelhecimento imunológico entre as duas cidades.

Essas diferenças nos padrões inflamatórios observados entre BH e SP sugerem que o envelhecimento imunológico é fortemente modulado pelo contexto urbano. Nós já demonstramos que diferentes contextos urbanos, como áreas endêmicas para doenças infecciosas, podem estar associados a variações no perfil inflamatório relacionadas à aceleração da idade epigenética (Coelho, 2025). De modo semelhante, um estudo recente sugere que indivíduos residentes em áreas industrializadas apresentam diferenças na produção de mediadores inflamatórios quando comparados àqueles que vivem em áreas não industrializadas (Franck et al., 2025). Em conjunto, esses achados reforçam a hipótese de que o fenômeno do *inflammaging* não é universal, sendo moldado por exposições ambientais específicas e pelos mecanismos adaptativos de remodelamento imunológico ativados em cada contexto urbano.

Esses achados são concordantes com o conceito de imunobiografia (Franceschi, 2017). A imunobiografia propõe que as variações nas exposições antigênicas ao longo da vida, considerando tipo, dose, frequência e ordem temporal, moldam progressivamente o perfil imunológico durante o envelhecimento. Nesse sentido, a imunossenescência é compreendida como o resultado acumulado dessas exposições, refletindo interações contínuas do sistema imunológico com bactérias, vírus, fungos, parasitas, nutrientes e metabólitos ao longo da vida

(Franceschi, 2017). Assim, cada indivíduo representa uma trajetória singular de envelhecimento imunológico, construída a partir de suas experiências imunológicas cumulativas.

Estudos têm demonstrado que o envelhecimento está associado a diversas alterações no perfil das células NK (Brauning et al., 2022; Almeida-Oliveira, 2011; Gounder, 2018). Considerando a população investigada neste estudo, a observação de envelhecimento epigenético acelerado entre os residentes de SP, em comparação aos de BH, associada à presença de perfis inflamatórios distintos, sugere que essas populações possam apresentar trajetórias divergentes de envelhecimento imunológico, potencialmente moduladas por diferenças contextuais de exposição ambiental urbana.

Assim, levantamos a hipótese de que essas diferenças estejam associadas a variações nos subtipos de células NK. Por essa razão, realizamos a fenotipagem dessas células, com o objetivo de identificar, por meio da citometria de fluxo multiparamétrica, diferenças nas frequências relativas dos subtipos de células NKT, NK citotóxicas, NK produtoras de citocinas e NK produtoras de quimiocinas. Esses subtipos foram posteriormente analisados quanto aos estados de ativação, senescência e exaustão. Entretanto, é importante considerar o caráter observacional da análise, que permite a identificação de associações robustas, mas não o estabelecimento de relações causais diretas.

Nossos achados revelaram que os indivíduos residentes em BH apresentaram maior frequência de células NKT (Fig. 20a), de células NK citotóxicas (Fig. 20b) e de fenótipos ativados, incluindo células NK produtoras de citocinas NKG2D⁺ (Fig. 20c), células NK citotóxicas NKG2D⁺ (Fig. 20d) e células NK CD69⁺ (Fig. 20e).

O subtipo NKT, observado em maior frequência entre os residentes de BH, representa um subconjunto especializado de linfócitos T inatos que reconhecem glicolípídios apresentados pela molécula CD1d, estruturalmente semelhante ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Uma vez ativadas, essas células são capazes de liberar rapidamente citocinas e quimiocinas com propriedades pró-inflamatórias e imunomoduladoras, destacando-se, entre elas, o interferon gama (IFN- γ) e a interleucina 4 (IL-4) (Kumar et al., 2017). Esses achados sugerem a presença de um ambiente imunológico mais responsivo, caracterizado pela ativação rápida da imunidade inata e pela capacidade de modular precocemente as respostas inflamatórias.

O aumento das células NK citotóxicas nos indivíduos residentes em BH pode refletir uma maior prontidão citotóxica da imunidade inata, potencialmente associada à preservação do estado

funcional ao longo do envelhecimento. Essas células destacam-se como linfócitos inatos capazes de reconhecer células-alvo por dois mecanismos distintos: a ausência ou redução da expressão de MHC de classe I e a ativação de receptores de superfície, como o NKG2D, que se liga a ligantes do tipo MIC e ULBP expressos por células estressadas ou infectadas por vírus (Radaev et al., 2001; Zingoni et al., 2018). Uma vez ativadas, liberam perforinas e granzimas, desencadeando a apoptose da célula-alvo.

As células NK produtoras de citocinas, que também apresentaram maior representação entre os residentes de BH, constituem um subtipo especializado na secreção de mediadores imunológicos após a ativação. Entre as principais citocinas produzidas por essas células destacam-se o IFN- γ , o TNF- β , a IL-5, a IL-10 e a IL-13 (Vivier et al., 2008). Esse perfil funcional pode contribuir para um equilíbrio mais eficiente entre respostas pró- e anti-inflamatórias, favorecendo um processo de envelhecimento imunológico mais balanceado.

Diversos estudos relatam uma diminuição significativa na frequência de células NK produtoras de citocinas e um aumento significativo das células citotóxicas com o avanço da idade (Almeida-Oliveira, 2011; Gounder, 2018). Entretanto, resultados divergentes também foram descritos (Dogra et al., 2020).

Apesar disso, a redução da atividade citotóxica das células NK com o envelhecimento tem sido amplamente documentada e está associada ao aumento da incidência de doenças infecciosas (Orange et al., 2006; Jost & Altfeld, 2013). O aumento do número de células NK citotóxicas observado durante o envelhecimento é interpretado como uma tentativa do sistema imunológico de compensar a perda das funções efetoras relacionadas à idade (Brauning et al., 2022; Solana & Peña, 1999; Kaszubowska, 2008; Solana, 1999). Entretanto, em idosos, as células NK apresentam resposta proliferativa reduzida à interleucina-2 (IL-2), além de exibirem expressão comprometida do receptor de ativação CD69 (Borrego et al., 1999).

Em conjunto, esses achados indicam que os indivíduos residentes em BH apresentam um perfil de células NK predominantemente ativado, sugerindo o desenvolvimento de mecanismos mais eficazes de proteção imunológica inata e um padrão de remodelamento imunológico distinto daquele observado nos residentes de SP. Esses achados são particularmente relevantes por integrarem, de forma inédita nesta coorte, a avaliação do envelhecimento epigenético com a caracterização detalhada do imunofenótipo de células NK, permitindo explorar como diferentes contextos ambientais urbanos podem modular trajetórias de envelhecimento imunológico. Nesse sentido, evidências recentes indicam que exposições ambientais podem influenciar

quantitativa e qualitativamente o compartimento de células NK ao longo da vida, reforçando a plausibilidade biológica das diferenças observadas entre as duas populações.

Já a coorte dos residentes de SP apresentou maior frequência de células NK com predomínio de um perfil associado à senescência e à exaustão, incluindo células NK citotóxicas CD57⁺ (Fig. 20f), NK citotóxicas PD1⁺ (Fig. 20g), NK citotóxicas coexpressando PD1⁺ e CD57⁺ (Fig. 20h), além de células NK produtoras de quimiocinas com expressão de CD57⁺ (Fig. 20i). Esse conjunto de fenótipos indica que, nos residentes de SP, as subpopulações das células NK são funcionalmente comprometidas, compatíveis com um estado de envelhecimento imunológico acelerado.

As moléculas CD57 e PD1 são amplamente utilizadas como marcadores de senescência e exaustão funcional, respectivamente, sendo diferencialmente expressas em células T e NK. PD-1 é uma proteína transmembrana pertencente à superfamília CD28/CTLA-4, amplamente expressa na superfície de células T ativadas, células B e monócitos, regulando negativamente a resposta imune humana. Nas células NK, a expressão de PD1 tem sido associada a contextos de estimulação crônica, como infecções virais persistentes por HIV (vírus da imunodeficiência adquirida) e CMV (citomegalovírus humano), estando relacionada à exaustão celular (Della Chiesa et al., 2016).

Enquanto a expressão de CD57 reflete um estado de diferenciação terminal associado à limitação proliferativa, a expressão de PD1 está relacionada à inibição funcional decorrente de estimulação antigênica crônica; dessa forma, a coexpressão dessas moléculas sugere um maior estado de comprometimento funcional das células NK. No contexto deste estudo, a maior frequência dessas populações entre os residentes de SP sugere exposição prolongada a estímulos antigênicos, favorecendo estados de senescência e exaustão das células NK. Além disso, a elevada frequência de células NK CD57⁺PD1⁺ observada nos residentes de SP sugere não apenas limitação proliferativa, mas também inibição funcional persistente, com potencial impacto negativo na eficácia da imunidade inata.

Um estudo recente em indivíduos de diferentes faixas etárias demonstrou que a expressão de CD57 e CD69 por células NK correlacionou-se positivamente com a idade, e que as células NK CD57⁺CD69⁺ de indivíduos idosos coexpressavam PD1 (Deng et al., 2024). Esses achados reforçam a associação entre a expressão de CD57 e PD1 e o processo de envelhecimento imunológico.

Estudos relatam um aumento significativo na frequência de células NK expressando CD57 em pessoas idosas (Tarazona et al., 2000; Bonafè et al., 2001; Dogra et al., 2020; Gayoso, 2011). Embora evidências sugiram a existência de subpopulações distintas de células NK CD57⁺, incluindo células terminalmente diferenciadas e células NK maduras (Kared et al., 2016, Yang, Siebert et al., 2019), a maior frequência dessas células nos indivíduos de SP sugere um predomínio de fenótipos associados à senescência do compartimento de células NK, possivelmente influenciado por exposições ambientais crônicas. Esse padrão é consistente com a aceleração do envelhecimento epigenético observada nessa população, reforçando a associação entre envelhecimento biológico e comprometimento funcional das células NK.

Corroborando com essa interpretação, estudos indicam que exposições ambientais relacionadas à poluição atmosférica podem modular o perfil de células NK desde fases precoces da vida. García-Serna et al. (2021) demonstraram que maiores concentrações de NO₂ durante a gestação associaram-se a uma redução média de 15% no número de células NK no sangue do cordão umbilical, sugerindo um impacto duradouro da poluição sobre a ontogenia dessas células (García-Serna et al, 2021). Por outro lado, Leonardi et al. (2020) observaram que o aumento das concentrações de material particulado esteve associado ao aumento do número de células NK, indicando que diferentes poluentes podem exercer efeitos distintos sobre esse tipo celular (Leonardi et al, 2020).

Ao analisarmos as matrizes de correlação entre os fenótipos de células NK e a aceleração do envelhecimento, verificamos que o correlograma dos indivíduos residentes em SP apresentou correlações positivas mais intensas entre os diversos fenótipos celulares, quando comparado ao dos residentes de BH (Fig. 21a, b). Ademais, a aceleração do envelhecimento nos indivíduos de SP mostrou-se associada a um número maior de correlações positivas com os fenótipos de células NK do que nos indivíduos de BH (Fig. 21c–d). A análise de correlação acrescenta uma perspectiva sistêmica ao evidenciar que a aceleração do envelhecimento se associa de maneira coordenada a múltiplos fenótipos celulares, reforçando a robustez e a integração biológica dos achados. Ainda que essas correlações reforcem a integração biológica dos fenótipos observados, elas não permitem inferir a direção das relações entre envelhecimento epigenético e alterações imunológicas.

O correlograma de BH indicou que a aceleração do envelhecimento está positivamente correlacionada, em sua maioria, com fenótipos de células NK ativadas (Fig. 21c). Esse padrão também reforça a interpretação de que, nos residentes de BH, o envelhecimento biológico ocorre em associação com mecanismos de ativação e remodelamento funcional da imunidade

inata. O envelhecimento biológico desses indivíduos está associado aos seguintes fenótipos de ativação, mais frequentes entre os residentes de BH: células NKT⁺ (Fig. 20a), células NK produtoras de citocinas com expressão de NKG2D⁺ (Fig. 20c), células NK citotóxicas NKG2D⁺ (Fig. 20d) e células NK citotóxicas com expressão de CD69 (Fig. 20e).

Já o correlograma dos indivíduos residentes em SP revelou que a aceleração do envelhecimento apresenta correlações positivas mais intensas com os fenótipos de células NK senescentes e exaustas (Fig. 21d). De forma concordante com os dados fenotípicos, esses resultados mostram que a aceleração do envelhecimento está associada aos seguintes fenótipos de senescência, os quais apresentaram maior frequência nos indivíduos de SP: células NK citotóxicas e produtoras de quimiocinas com expressão de CD57⁺ (Fig. 20f,i), reforçando o perfil imunológico senescente observado nessa população.

Diversas alterações importantes também são descritas nos linfócitos B ao longo do processo de envelhecimento. Entre essas alterações, destacam-se a diminuição do repertório dessas células (Weksler et al., 2020), o aumento das células B1a (Veneri et al., 2007), defeitos na linfopoese de células B (McKenna et al., 2001), no desenvolvimento e na homeostase dessas células (Frasca et al., 2008) e, principalmente, o aumento da frequência de linfócitos B de memória (Colonna-Romano et al., 2003). Essas alterações são consideradas componentes centrais da imunossenescência e podem impactar diretamente a qualidade e a diversidade da resposta imune adaptativa, contribuindo para o declínio da eficácia dos anticorpos produzidos por indivíduos idosos em resposta a infecções e vacinas (Frasca & Blomberg, 2020). Além dos processos intrínsecos ao envelhecimento, evidências crescentes indicam que fatores ambientais, como a exposição crônica à poluição atmosférica, podem modular a diferenciação, a ativação e a distribuição dos subtipos de linfócitos B.

Nossos dados indicam que os indivíduos residentes em BH apresentam maior frequência de linfócitos B de memória não clássicos (CD27⁻, CD24⁺ CD38^{-/lo}) (Fig. 22a), ao passo que os residentes em SP exibem maior frequência de células secretoras de anticorpos (ASCs) (CD27⁺, CD38^{hi}) (Fig. 22b), plasmócitos imaturos (CD138⁺) (Fig. 22c) e linfócitos B de memória maduros (CD27⁺, CD24⁺, CD38^{+/-}) (Fig. 22d). Esse padrão sugere que as coortes apresentam perfis distintos de diferenciação e ativação de células B, possivelmente associados a diferentes níveis de estímulo antigênico, inflamação sistêmica ou características ambientais específicas de cada localidade.

Embora estudos iniciais tenham indicado que o receptor CD27 é expresso predominantemente em células B de memória em humanos, evidências mais recentes demonstram a existência de subpopulações de células B de memória que não expressam CD27, mas que podem expressar outros marcadores, como CD38 e CD24 (Wei et al., 2007; Culton et al., 2007; Sanz et al., 2008). A identificação dessas subpopulações é particularmente relevante para a interpretação do aumento de linfócitos B de memória não clássicos observado nos residentes de BH, uma vez que amplia a compreensão da heterogeneidade funcional das células B de memória, inclusive no contexto do envelhecimento e de exposições antigênicas ambientais persistentes.

Estudos que demonstram que exposições à poluição atmosférica podem modular quantitativamente e qualitativamente o compartimento de células B. Raqib et al. (2022) mostraram que o aumento de duas vezes nos níveis de PM_{2,5} em mulheres cronicamente expostas à poluição domiciliar por biomassa associou-se a alterações nas proporções de células B naíve/imaturas, plasmablastos e à redução de células B de memória, além de elevação de IgE plasmática. Embora alguns estudos não tenham identificado alterações significativas na frequência total de linfócitos B CD19⁺ após exposição ao PM_{2,5} (Pope et al., 2016), outros demonstraram que a exposição aguda a gases de escape de motores a diesel pode reduzir as proporções de células B (Li et al., 2022), e que aumentos nas concentrações de material particulado estão associados ao aumento do número de linfócitos B e dos níveis séricos de IgG, especialmente em relação ao PM_{2,5} (Leonardi et al., 2000).

Considerando a dinâmica de ativação e diferenciação das células B, todas essas células têm origem em células B naíve, que, após ativação dependente de antígeno e auxílio de linfócitos T helper, podem se diferenciar em plasmócitos ou persistir na circulação como células B de memória. Nesse contexto, a maior frequência de ASCs observada nos residentes de SP pode refletir um estado de ativação humoral mais pronunciado, associado à secreção inicial de IgM e, posteriormente, à geração de respostas secundárias mediadas por IgG e IgA (Racine et al., 2011; Scharer et al., 2020). Estudos experimentais e populacionais sugerem que exposições ambientais, como a poluição do ar, podem favorecer esse estado de ativação humoral sustentada, influenciando tanto a diferenciação terminal das células B quanto a produção de imunoglobulinas (Raqib et al, 2022; Leonardi et al, 2000).

Buffa e colaboradores (Buffa et al., 2013) demonstraram que o perfil de linfócitos B CD38-CD24-, fenótipo semelhante ao observado com maior frequência em nossa coorte de indivíduos de SP, apresentou-se mais prevalente em idosos saudáveis, porém menos frequente em centenários saudáveis, utilizados como modelo de envelhecimento bem-sucedido. Essa

observação sugere que a expansão dessa subpopulação pode estar associada a trajetórias de envelhecimento menos favoráveis, uma vez que os autores propõem que esse perfil contribui para um estado inflamatório crônico de baixo grau, hipótese que pode ser relevante para a interpretação dos nossos achados.

Nossos correlogramas indicam que os indivíduos residentes em SP apresentaram correlações positivas mais intensas e um número maior de associações entre a aceleração do envelhecimento biológico (avaliado por marcadores epigenéticos) e os subtipos de células B, em comparação aos residentes de BH (Fig. 23b, a). A matriz de correlação dos participantes de BH revelou que a aceleração do envelhecimento se correlacionou positivamente, em ordem decrescente, com linfócitos B de memória não clássicos, plasmócitos imaturos, linfócitos B de memória clássicos IgD⁺ e linfócitos B maduros de memória precoce (Fig. 23c). Por outro lado, a matriz correspondente aos residentes de SP demonstrou correlações positivas, também em ordem decrescente, com linfócitos B de memória não clássicos, linfócitos B maduros de memória precoce, linfócitos B de memória maduros, linfócitos B de memória clássicos IgD⁺ e ASCs (Fig. 23d).

Em conjunto, esses resultados sugerem que diferentes perfis de diferenciação e ativação de células B estão associados à aceleração do envelhecimento epigenético nas coortes estudadas. O aumento da frequência de linfócitos B de memória não clássicos nos residentes de BH (Fig. 22a) pode refletir um perfil de adaptação imunológica associado a exposições antigênicas crônicas, enquanto o aumento de linfócitos B de memória maduros e de ASCs nos residentes de SP pode indicar uma ativação humoral sustentada, potencialmente vinculada a um ambiente inflamatório mais intenso, contribuindo para a aceleração do envelhecimento epigenético observada nesse grupo.

Embora o envelhecimento esteja associado a alterações nos perfis das células NK e dos linfócitos B, as mudanças observadas nos linfócitos T se destacam como uma das principais características associadas ao processo de senescência, refletindo modificações nos estados de ativação, diferenciação e funcionalidade celular (Mittelbrunn & Kroemer, 2021). Evidências adicionais indicam que esses processos podem ser modulados por diferenças nas exposições ambientais, as quais influenciam tanto a polarização funcional quanto a distribuição dos subtipos de linfócitos T, contribuindo para trajetórias distintas de imunossenescência.

Nesse contexto, nossos resultados indicam que os indivíduos residentes em BH apresentam maior frequência de linfócitos T CD4⁺ com perfil efetor (EFF) (Fig. 24a) e de células

CD4⁺CD28⁻PD-1⁺ (Fig. 24b), sugerindo ativação imunológica e senescência celular, enquanto os residentes em SP exibem maior representação de linfócitos T CD4⁺ de memória central (Fig. 24c) e de subpopulações caracterizadas pela perda de CD28 (Fig. 24d-f) e pela expressão de receptores inibitórios, como CD57 (Fig. 24d), KLRG1 (Fig. 24e, g) e TIGIT (Fig. 24f, h), fenótipos fortemente associados à diferenciação terminal, senescência e exaustão celular (Laphanuwat et al., 2023; Pereira & Akbar, 2016). Esse padrão é compatível com achados experimentais que demonstram que a exposição a material particulado urbano pode potencializar a ativação funcional de linfócitos T, especialmente CD8⁺, induzindo maior secreção de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos, como TNF- α , IL-13 e granzimas, o que pode favorecer estados de ativação crônica e diferenciação terminal (Pfeffer et al., 2018).

A análise integrada desses achados indica que, entre os residentes em BH, predomina um perfil caracterizado por maior ativação imunológica, enquanto, entre os residentes em SP, observa-se um perfil de células T CD4⁺ mais diferenciadas e funcionalmente comprometidas, em consonância com o perfil observado para as células NK. Diferenças ambientais, como a exposição crônica a poluentes atmosféricos, têm sido associadas tanto ao aumento de subpopulações T auxiliares do tipo Th1 quanto à redução de células T reguladoras, reforçando a hipótese de que contextos ambientais distintos possam moldar perfis funcionais divergentes entre as coortes (García-Serna et al., 2021).

A expressão aumentada de KLRG1 nos subtipos de linfócitos T CD4⁺ entre os indivíduos de SP (Fig. 24e, g) reforça a associação com redução da capacidade proliferativa, sendo relevante destacar que esse marcador pode estar presente tanto em contextos de senescência quanto de exaustão celular (Pereira & Akbar, 2016). De forma complementar, embora os indivíduos de BH apresentem maior frequência de linfócitos T CD4⁺PD-1⁺ (Fig. 24b), esse achado deve ser interpretado com cautela, uma vez que PD-1 também é expresso em células T cronicamente ativadas e não constitui um marcador exclusivo de exaustão associado ao envelhecimento (Im et al., 2016; Lee et al., 2016). Adicionalmente, a maior frequência de células CD4⁺TIGIT⁺ (Fig. 24f, h) nos indivíduos de SP indica a presença de fenótipos associados à exaustão imunológica também nessa coorte (Pieren et al., 2022). Esse achado corrobora com estudos que demonstram que exposições ambientais crônicas podem favorecer a expressão sustentada de receptores inibitórios em células T, refletindo adaptação regulatória frente a estímulos inflamatórios persistentes.

A análise de linfócitos T CD8⁺ amplia e complexifica esse cenário. Os indivíduos residentes em BH apresentaram maior frequência de células CD8⁺KLRG1⁺ (Fig. 25b) e CD8⁺TIGIT⁺ (Fig.

25c), indicando a coexistência de fenótipos de diferenciação terminal e exaustão funcional. Em contraste, os residentes em SP exibiram maior frequência de linfócitos T CD8+PD-1+ (Fig. 25d), CD8+CD28-CD57+ (Fig. 25e), efetores de memória CD28-PD-1+ (Fig. 25f), linfócitos T CD8+ efetores (EFF) (Fig. 25g) e EFF exaustos PD-1+(Fig. 25h), além de menor frequência de células T CD8+ naïve (Fig. 25a), conjunto de achados compatível com um perfil imunológico mais senescente nessa coorte. Estudos populacionais e experimentais demonstram que o aumento da exposição ao material particulado está associado ao incremento de linfócitos T CD4+ e CD8+ circulantes, bem como à intensificação de respostas inflamatórias sistêmicas, o que pode acelerar a diferenciação e a perda do compartimento naïve dessas células (Leonardi et al., 2000; Pope et al., 2016).

Apesar dessas diferenças, é relevante destacar que ambas as coortes apresentam combinações de fenótipos ativados, senescentes e exaustos, reforçando que o envelhecimento imunológico não se caracteriza por estados dicotômicos, mas por arranjos dinâmicos e sobrepostos de funcionalidade celular. Nesse sentido, receptores inibitórios como TIGIT e PD-1 desempenham papel central na modulação da resposta imune, atuando em vias regulatórias que equilibram ativação e inibição, particularmente em contextos de estimulação crônica (Joller et al., 2024). Além disso, evidências recentes indicam que exposições ambientais podem modular esses processos por mecanismos epigenéticos, incluindo alterações na atividade de enzimas envolvidas na desmetilação do DNA em células T, associadas à secreção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias (Li et al., 2022).

Por fim, embora as coortes de BH e SP apresentem diferenças nas frequências dos subtipos de linfócitos T CD4+ e CD8+, as matrizes de correlação entre a aceleração do envelhecimento e os fenótipos dessas células exibiram intensidade e número de associações semelhantes (Fig. 25a, d; Fig. 27a, d), sugerindo que os processos de envelhecimento biológico relacionados aos linfócitos T podem convergir funcionalmente, apesar de trajetórias fenotípicas distintas. Esse achado reforça a complexidade do envelhecimento imunológico humano e destaca a importância de abordagens integrativas para a sua compreensão.

O correlograma da aceleração do envelhecimento epigenético com os fenótipos de linfócitos T CD4+ dos indivíduos residentes em BH revelou correlações positivas com fenótipos associados à senescência celular, à exaustão ou à combinação de ambos os estados disfuncionais (Fig. 25c). De forma semelhante, o correlograma dos indivíduos residentes em SP também evidenciou correlações com fenótipos relacionados à memória e a estados de senescência e/ou exaustão (Fig. 25d), embora os marcadores expressos nesses estados disfuncionais sejam distintos entre

as duas cidades. Nesse contexto, apenas o subtipo CD28+PD-1+, cuja frequência foi mais elevada nos indivíduos residentes em BH (Fig. 24b), apresentou correlação positiva com a aceleração do envelhecimento nessa coorte. Em contrapartida, os subtipos CM, CD28-CD57+ e CD28-KLRG1+ mostraram correlação positiva com a aceleração do envelhecimento epigenético na coorte de SP.

O correlograma da aceleração do envelhecimento epigenético em associação com os subtipos de linfócitos T CD8+ dos indivíduos residentes em BH e SP revelou que a aceleração do envelhecimento biológico se correlacionou positivamente com subtipos de linfócitos que expressam marcadores de exaustão funcional ou perfis mistos de disfunção (Fig. 27c,d). Além disso, os resultados indicaram que apenas os linfócitos T CD8+TIGIT+, que apresentaram maior frequência nos indivíduos residentes em BH, exibiram correlação positiva com a aceleração do envelhecimento nessa coorte. Por outro lado, os linfócitos T CD8+ efetores CD28-CD57+ apresentaram correlação positiva com a aceleração do envelhecimento epigenético nos indivíduos residentes em SP.

Considerando que as correlações observadas se apresentam de forma distinta entre as coortes, é plausível que esses padrões reflitam trajetórias divergentes de imunossenescência, potencialmente moduladas por exposições ambientais crônicas e por mecanismos epigenéticos associados, em concordância com o que já foi previamente observado para os mediadores inflamatórios, os subtipos de células NK e os linfócitos B.

Os indivíduos residentes em SP apresentaram um perfil sugestivo de imunossenescência mais acentuado em comparação aos indivíduos residentes em BH. Essa interpretação é sustentada pela maior aceleração do envelhecimento epigenético (Fig. 17a–f), pela maior frequência de células NK com fenótipos associados à senescência (Fig. 20f–i), pelo aumento da frequência de células B em estágios mais avançados de diferenciação (Fig. 22b–d), bem como pela maior frequência de linfócitos T CD4+ e T CD8+ exibindo fenótipos compatíveis com estados de senescência e/ou exaustão funcional (Fig. 24c–h; Fig. 25d–f, h–i). Adicionalmente, observou-se uma maior proporção de indivíduos com níveis elevados de IL-9, IL-5 e IL-4 (Fig. 18l), citocinas classicamente associadas à polarização da resposta imune do tipo 2, frequentemente descrita em contextos de inflamação alérgica, mas também modulada por outros fatores ambientais e infecciosos.

Diante desse conjunto de achados, levantamos a hipótese de que diferenças nos padrões de emissão de poluentes atmosféricos entre as duas cidades possam estar associadas, em nível

populacional, aos distintos perfis imunológicos observados, sendo importante ressaltar que essa abordagem possui caráter associativo e não permite inferências causais diretas entre exposição ambiental e resposta biológica. Para explorar essa hipótese, utilizamos dados públicos disponibilizados pela Plataforma da Qualidade do Ar, do IEMA, referentes ao período de 2015 a 2019, anterior à coleta das amostras dos voluntários deste estudo.

Nossos resultados indicaram que a cidade de SP apresentou maiores emissões de material particulado (PM₁₀ e PM_{2.5}) (Fig. 28a, b), monóxido de carbono (CO) (Fig. 28c) e dióxido de nitrogênio (NO₂) (Fig. 28d). Em contraste, BH apresentou maiores emissões de ozônio (O₃) (Fig. 28e) e dióxido de enxofre (SO₂) (Fig. 28f). Esses achados podem ser parcialmente explicados pelo fato de SP ser a cidade mais populosa do Brasil, caracterizada por intenso tráfego de veículos automotores, fator amplamente reconhecido como determinante da poluição atmosférica (Dos Santos et al., 2022). Adicionalmente, SP apresentou, em nossas análises, médias anuais de PM_{2.5} (Fig. 28b) superiores ao limite de 17 µg/m³ recomendado pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nos anos de 2015 e 2018 (CONAMA, 2024).

Os poluentes com maior emissão em SP (PM₁₀, PM_{2.5}, CO e NO₂) (Fig. 28a–d) estão frequentemente associados à processos inflamatórios crônicos, estresse oxidativo e disfunções respiratórias (de Toledo & Nardocci, 2011). Evidências recentes indicam que esses poluentes, particularmente o PM_{2.5}, também exercem efeitos sistêmicos por meio de alterações epigenéticas. Uma meta-análise de estudos observacionais demonstrou associação entre a exposição ao PM_{2.5} e modificações na metilação do DNA, os estudos observaram hipermetilação em genes candidatos, como *ERCC3* e *SOX2*, envolvidos em processos de reparo do DNA e regulação celular (Wu et al., 2021). Adicionalmente, análises epigenômicas em larga escala (EWAS) identificaram múltiplos sítios CpG e regiões diferencialmente metiladas associadas à poluição atmosférica, incluindo loci relacionados à resposta imune e à regulação do ciclo celular (Wu et al., 2021), sugerindo que a exposição a esses poluentes possa contribuir para as alterações nos relógios epigenéticos observadas em nossos resultados (Fig. 17a–f).

Por outro lado, os poluentes predominantes em BH (O₃ e SO₂) (Fig. 28e–f) apresentam mecanismos de toxicidade distintos, com impactos imunológicos potencialmente diferentes daqueles associados ao material particulado e aos gases derivados majoritariamente da queima veicular. Estudos epigenômicos também sugerem que poluentes gasosos, como NO₂, podem induzir padrões específicos de metilação do DNA, frequentemente associados ao aumento da metilação em regiões regulatórias, afetando vias inflamatórias, metabólicas e cardiovasculares (Eze et al., 2020). Dessa forma, embora ambas as cidades enfrentem desafios relevantes

relacionados à qualidade do ar, os perfis de exposição ambiental não são equivalentes, o que pode contribuir para respostas biológicas e epigenéticas distintas entre as populações estudadas.

BH, capital do estado de Minas Gerais, é historicamente reconhecida como uma das cidades mais arborizadas do país, o que lhe conferiu o título de “Cidade Jardim”. Contudo, nas últimas décadas, o crescimento da atividade industrial, aliado à expansão urbana, tem contribuído para a deterioração progressiva da qualidade do ar. Em concordância com nossos achados, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012) indicam que a Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH) figura entre as principais emissoras de ozônio do país. BH apresentou concentrações médias anuais em torno de $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$, superiores às observadas em SP, que atingiram aproximadamente $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Fig. 28e).

Nesse sentido, estudos recentes reforçam a relevância biológica dessas exposições. A análise epigenômica conduzida na coorte NSPT, com mais de 3.000 participantes, identificou 177 sítios CpG e 107 regiões diferencialmente metiladas associadas à exposição de curto e médio prazos ao $\text{PM}_{2.5}$, envolvendo genes relacionados ao envelhecimento, imunidade, inflamação e carcinogênese (Cai et al., 2024). De modo semelhante, o estudo Normative Aging Study demonstrou que tanto a massa total de $\text{PM}_{2.5}$ quanto seus componentes metálicos estão associados a milhares de sondas e regiões diferencialmente metiladas, com enriquecimento de vias relacionadas à inflamação, imunidade, doenças cardiovasculares e câncer, especialmente aquelas vinculadas a fontes veiculares (Wang et al., 2022).

Em conjunto, essas evidências sugerem que diferentes perfis de poluição atmosférica, como os observados entre SP e BH, não apenas modulam respostas inflamatórias, mas também podem induzir alterações epigenéticas relevantes, afetando vias biológicas centrais relacionadas ao envelhecimento, à resposta imune e à regulação celular. Além disso, esses achados indicam que, mesmo em contextos nos quais as concentrações de poluentes se mantêm abaixo dos limites superiores estabelecidos por instituições governamentais, variações relativas nos níveis de exposição ambiental podem ser suficientes para modificar padrões epigenéticos associados a processos biológicos fundamentais, potencialmente influenciando trajetórias diferenciadas de saúde ao longo da vida.

Com o objetivo de contextualizar os possíveis impactos desses poluentes sobre a saúde da população em nível coletivo, realizamos uma comparação das taxas de hospitalizações por doenças do sistema respiratório, por 100.000 habitantes, com base nos registros do DATASUS, no mesmo período analisado. Essas análises, de natureza ecológica, revelaram que SP registrou

um número mais elevado de hospitalizações por doenças respiratórias em comparação a BH (Fig. 29a), resultado que deve ser interpretado com cautela, uma vez que não estabelece vínculo direto com os indivíduos avaliados neste estudo.

No que se refere à polarização da resposta imune do tipo 2 observada nos indivíduos residentes em SP, evidenciada pela produção de mediadores plasmáticos (Fig. 18f–g, l), é importante considerar que esse padrão imunológico, além de estar associado a doenças alérgicas (Ogulur et al., 2025), também pode ser influenciado por infecções parasitárias, condições socioeconômicas, exposições ambientais concomitantes e outros determinantes contextuais (Romagnani, 1996). Com base nessa premissa, avaliamos o número de hospitalizações por infecções e doenças parasitárias, por 100.000 habitantes, utilizando o mesmo banco de dados populacionais. Os resultados indicaram taxas mais elevadas em SP (Fig. 30a), o que pode refletir, ao menos em parte, diferenças estruturais e sociais entre as cidades, incluindo desigualdades socioeconômicas, e não exclusivamente variações na resposta imunológica individual (Tabela 6).

A poluição atmosférica e as mudanças climáticas estão fortemente interligadas, uma vez que os gases responsáveis pela redução da qualidade do ar são frequentemente coemitidos com aqueles que intensificam o efeito estufa (Pinho-Gomes et al., 2023). Ademais, tanto a poluição do ar quanto as mudanças climáticas representam ameaças significativas à saúde da população em escala global (Briggs, 2003). Dessa forma, ações antrópicas que impactam o meio ambiente também acarretam consequências diretas para a saúde humana e animal. Nesse contexto, nossos dados corroboram a relevância do conceito de Saúde Única, também conhecido como One Health, proposto pela OMS, uma abordagem integrada que reconhece a interdependência entre a saúde humana, animal e ambiental.

Sob essa perspectiva, os resultados apresentados ao longo deste capítulo devem ser interpretados a partir dessa abordagem integrada, na qual alterações observadas nos níveis molecular, celular e populacional são compreendidas como dimensões inter-relacionadas de um mesmo fenômeno biológico complexo, ainda que analisadas em um contexto observacional.

Em conjunto, nossos resultados indicam que os indivíduos residentes em SP tendem a apresentar um perfil imunológico compatível com maior grau de imunossenescência em comparação aos indivíduos de BH, refletido por maior aceleração do envelhecimento epigenético (Fig. 17), por perfis inflamatórios distintos (Fig. 18) e por maior frequência de fenótipos celulares associados à senescência e à exaustão funcional (Fig. 20, 22, 24 e 26). Esses

achados sustentam a hipótese de que diferentes contextos urbanos possam estar associados a trajetórias divergentes de envelhecimento imunológico, expressas de forma integrada nos níveis epigenético, inflamatório e celular, sugerindo interações entre exposição ambiental, modulação imunológica e desfechos em saúde. Contudo, essas associações não permitem o estabelecimento de relações causais diretas, ressaltando a necessidade de investigações longitudinais e mecanicistas futuras para elucidar as conexões entre exposições ambientais, modulação imunológica e envelhecimento biológico humano.

9. CONCLUSÃO

O envelhecimento da população mundial apresenta diversos desafios em níveis individuais e coletivos. Já está bem estabelecido que ações individuais, como a escolha alimentar, a prática de atividade física e a qualidade do sono, são importantes determinantes do processo de envelhecimento. Neste trabalho, buscamos avaliar os efeitos do meio ambiente sobre o envelhecimento e a imunossenescência, utilizando metodologias capazes de detectar variações epigenéticas no DNA, indicativas da senescência biológica, bem como alterações no sistema imune.

O processo de metilação do DNA e a dinâmica de funcionamento do sistema imune variam ao longo da vida, atuando como sensores das interações do corpo com o meio ambiente. Assim, esses mecanismos fornecem marcadores capazes de refletir como os efeitos das ações humanas sobre o ambiente repercutem na determinação da imunobiografia, ou seja, o histórico de interações do sistema imune com antígenos e estressores, e na modulação do ritmo de envelhecimento. Nossos resultados mostraram que a exposição contínua a ambientes com alta prevalência de infecções, como ocorre em áreas endêmicas, assim como à poluição atmosférica associada ao acesso desigual a cuidados de saúde, típica de grandes centros urbanos, promove a aceleração da senescência. As variações geográficas e demográficas analisadas refletem o impacto de múltiplos fatores sociais e políticos que afetam o meio ambiente, o clima e, em última instância, a saúde e a longevidade das populações.

Recentemente, o conceito de exposoma foi proposto para integrar os efeitos de fatores físicos e sociais do ambiente sobre o organismo. O exposoma representa o conjunto de exposições físicas e sociais acumuladas ao longo da vida, resultando em fatores de risco e proteção que modulam o processo de envelhecimento e seus efeitos no corpo (Woods et al., 2025). Um estudo recente realizado em 40 países mostrou que determinantes físicos, como a qualidade do ar, sociais, como desigualdades socioeconômicas e de gênero e migração, e sociopolíticos, como liberdade política e representatividade democrática, influenciam significativamente o envelhecimento saudável ou acelerado, revelando disparidades substanciais entre as nações (Hernandez et al., 2025).

Em síntese, nossos resultados indicam que tanto o endemismo de doenças infecciosas quanto a poluição do ar influenciam o ritmo e o perfil do envelhecimento biológico. De modo geral, a aceleração do envelhecimento parece estar mais associada ao equilíbrio da resposta imune

diante dos estressores do que ao simples contato com múltiplos antígenos. Observamos, ainda, que indivíduos com uma resposta imune mais homogênea, caracterizada pela produção equilibrada de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios, apresentam menor aceleração do envelhecimento biológico em comparação àqueles com respostas mais heterogêneas.

Considerando que este trabalho demonstrou, de forma integrada, a influência do endemismo de doenças infecciosas e da poluição do ar sobre o ritmo e o perfil do envelhecimento biológico nas coortes examinadas, seus achados contribuem para o avanço da compreensão dos mecanismos pelos quais fatores ambientais, sociais e imunológicos moldam o envelhecimento humano. Ao evidenciar que o equilíbrio da resposta imune desempenha papel central na modulação da senescência biológica, esta tese reforça a relevância de abordagens que integrem exposições ambientais, imunobiografia e determinantes sociais da saúde. Nesse contexto, os resultados apresentados oferecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias voltadas à promoção do envelhecimento saudável e fundamentam a necessidade de políticas públicas direcionadas à redução das desigualdades ambientais e sociais, com impacto direto na expectativa e na qualidade de vida das populações.

10. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K., Trotta, E., Simeonov, D. R., Marson, A., & Bluestone, J. A. (2018). Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. In *Sci. Immunol* (Vol. 3). <https://www.science.org>
- Ajoolabady, A., Pratico, D., Tang, D., Zhou, S., Franceschi, C., & Ren, J. (2024). Immunosenescence and inflammaging: Mechanisms and role in diseases. *Ageing Research Reviews*, 101, 102540. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102540>
- Aliyu, M., Zohora, F. T., Anka, A. U., Ali, K., Maleknia, S., Saffarioun, M., & Azizi, G. (2022). Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. In *International Immunopharmacology* (Vol. 111). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109130>
- Alkharashi, N. A. O., Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., & Alshatwi, A. A. (2017). Cadmium triggers mitochondrial oxidative stress in human peripheral blood lymphocytes and monocytes: Analysis using in vitro and system toxicology approaches. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 42, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.04.014>
- Almeida-Oliveira, A., Smith-Carvalho, M., Porto, L. C., Cardoso-Oliveira, J., Ribeiro, A. dos S., Falcão, R. R., Abdelhay, E., Bouzas, L. F., Thuler, L. C. S., Ornellas, M. H., & Diamond, H. R. (2011). Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Human Immunology*, 72(4), 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.009>
- ANS/IBGE. (2021). População com plano de saúde (%). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Atlas Brasil (PNUD). (2010). Diferença de longevidade (IDSL). Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento.
- Atlas Brasil (PNUD). (2010). Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDH-M). Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento.
- Bagnara, G. P., Bonsi, L., Strippoli, P., Bonifazi, F., Tonelli, R., Addato, S. D. ', Paganelli, R., Scala, E., Fagiolo, U., Monti, D., Cossarizza, A., Bonafe, M., & Franceschi, C. (2000). Hemopoiesis in healthy old people and centenarians: well-maintained responsiveness of CD34+ cells to hemopoietic growth factors and remodeling of cytokine network. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(2), B61–B66. <https://doi.org/10.1093/gerona/55.2.B61>

Barouki, R., Kogevinas, M., Audouze, K., Belesova, K., Bergman, A., Birnbaum, L., Boekhold, S., Denys, S., Desseille, C., Drakvik, E., Frumkin, H., Garric, J., Destoumieux-Garzon, D., Haines, A., Huss, A., Jensen, G., Karakitsios, S., Klanova, J., Koskela, I.-M., ... Vineis, P. (2021). The COVID-19 pandemic and global environmental change: Emerging research needs. *Environment International*, 146, 106272. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106272>

Bent, R., Moll, L., Grabbe, S., & Bros, M. (2018). Interleukin-1 beta—A friend or foe in malignancies? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19082155>

Bhansali, I., Lips, S., Martinez, E. C., Herberth, G., Zenclussen, A., Jahnke, A., & Pierzchalski, A. (2025). Microplastic leachates may modulate immune cell responses in human peripheral blood in vitro. *Toxicology Letters*, 411(Suppl.), S189.

Bloomberg, M., Muniz-Terrera, G., Brocklebank, L., & Steptoe, A. (2024). Healthy lifestyle and cognitive decline in middle-aged and older adults residing in 14 European countries. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49262-5>

Bonafè, M., Valensin, S., Gianni, W., Marigliano, V., & Franceschi, C. (2001). The unexpected contribution of immunosenescence to the leveling off of cancer incidence and mortality in the oldest old. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 39(3), 227–233. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00168-8](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00168-8)

Borodkina, A. V, Deryabin, P. I., Giukova, A. A., & Nikolsky, N. N. (2018). “Social Life” of Senescent Cells: What Is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, 10(1), 4–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29713514>

Borrego, F., Alonso, M. C., Galiani, M. D., Carracedo, J., Ramirez, R., Ostos, B., Peña, J., & Solana, R. (1999). NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Experimental Gerontology*, 34(2), 253–265. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(98\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(98)00076-X)

Brach, M. A., deVos, S., Gruss, H. J., & Herrmann, F. (1992). Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*, 80(11), 2920–2924. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1280481>

Brandt, E. B., Kovacic, M. B., Lee, G. B., Gibson, A. M., Acciani, T. H., Le Cras, T. D., Ryan, P. H., Budelsky, A. L., & Khurana Hershey, G. K. (2013). Diesel exhaust particle induction of

IL-17A contributes to severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1194–1204.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.06.048>

Brauning, A., Rae, M., Zhu, G., Fulton, E., Admasu, T. D., Stolzing, A., & Sharma, A. (2022). Aging of the Immune System: Focus on Natural Killer Cells Phenotype and Functions. In *Cells* (Vol. 11, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11061017>

Briggs, D. (2003). Environmental pollution and the global burden of disease. *British Medical Bulletin*, 68(1), 1–24. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg019>

Buffa, S., Pellicanò, M., Bulati, M., Martorana, A., Goldeck, D., Caruso, C., Pawelec, G., & Colonna-Romano, G. (2013). A novel B cell population revealed by a CD38/CD24 gating strategy: CD38–CD24– B cells in centenarian offspring and elderly people. *AGE*, 35(5), 2009–2024. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9488-5>

Caetano Faria, A. M., Monteiro De Moraes, S., Ferreira De Freitas, L. H., Speziali, E., Figueiredo Soares, T., Pretti Figueiredo-Neves, S., Vitelli-Avelar, D. M., Martins, M. Â., Bastos Dias Barbosa, K. V., Basseti Soares, E., Sathler-Avelar, R., Peruhype-Magalhães, V., Cardoso, G. M., Comin, F., Teixeira, R., Elói-Santos, S. M., Magalhães Queiroz, D. M., Corrêa-Oliveira, R., Bauer, M. E., ... Martins-Filho, O. A. (2008). Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *NeuroImmunoModulation*, 15(4–6), 365–379. <https://doi.org/10.1159/000156478>

Candore, G., Lorenzo, G. Di, Melluso, M., Cigna, D., Colucci, A. T., Modica, M. A., & Caruso, C. (1993). γ -Interferon, Interleukin-4 and Interleukin-6 In Vitro Production in Old Subjects. *Autoimmunity*, 16(4), 275–280. <https://doi.org/10.3109/08916939309014646>

Caruso, C., Accardi, G., Aiello, A., Calabrò, A., Ligotti, M. E., & Candore, G. (2022). Lessons from Sicilian centenarians for anti-ageing medicine. The Oxi-inflammatory status. *Translational Medicine @ UniSa*, 24(2), 16–23. <https://doi.org/10.37825/2239-9747.1036>

Castle, S., Uyemura, K., Wong, W., Modlin, R., & Effros, R. (1997). Evidence of enhanced type 2 immune response and impaired upregulation of a type 1 response in frail elderly nursing home residents. *Mechanisms of Ageing and Development*, 94(1–3), 7–16. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(96\)01821-0](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(96)01821-0)

CFM. (2020). Médicos por 10 mil habitantes. Conselho Federal de Medicina.

CFM/IPEA. (2020). Índice de Concentração (IC) de médicos. Conselho Federal de Medicina e Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.

Coelho, M. M., Moreira, F. C., Zuccherato, L. W., Ventura, L. H. de A., Camatta, G. C., Starling-Soares, B., Torres, L., Durso, D. F., Sato, H. I., da Costa, M. S., Guimarães, H. C., Barbuto, R. C., Júnior, M. L. O., Speziali, E., Tupinambas, U., Teixeira, S. M. R., Silveira-Nunes, G., Teixeira-Carvalho, A., Maioli, T. U., & Faria, A. M. C. (2025). Living in endemic area for infectious diseases is associated to differences in immunosenescence and inflammatory signatures. *Frontiers in Immunology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1547854>

Cohen, A. A., Legault, V., & Fülöp, T. (2020). What if there's no such thing as "aging"? *Mechanisms of Ageing and Development*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111344>

Colonna-Romano, G., Bulati, M., Aquino, A., Scialabba, G., Candore, G., Lio, D., Motta, M., Malaguarnera, M., & Caruso, C. (2003). B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(4), 389–393. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(03\)00013-7](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(03)00013-7)

Comin, F., Speziali, E., Martins-Filho, O. A., Caldas, I. R., Moura, V., Gazzinelli, A., Correa-Oliveira, R., & Faria, A. M. C. (2007). Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clinical and Experimental Immunology*, 149(2), 274–284. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03403.x>

CULTON, D. A., NICHOLAS, M. W., BUNCH, D. O., ZHEN, Q. L., KEPLER, T. B., DOOLEY, M. A., MOHAN, C., NACHMAN, P. H., & CLARKE, S. H. (2007). Similar CD19 Dysregulation in Two Autoantibody-Associated Autoimmune Diseases Suggests a Shared Mechanism of B-Cell Tolerance Loss. *Journal of Clinical Immunology*, 27(1), 53–68. <https://doi.org/10.1007/s10875-006-9051-1>

DataSUS. (2022). Mortalidade infantil (por 1.000 nascidos). Ministério da Saúde.

DataSUS. (2022). Tempo médio para atendimento no SUS (dias). Ministério da Saúde.

Della Chiesa M, Pesce S, Muccio L, Carlomagno S, Sivori S, Moretta A, Marcenaro E. (2016) Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol.*, 7:351. doi: 10.3389/fimmu.2016.00351.

De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., & Ginaldi, L. (2005a). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Letters*, 579(10), 2035–2039. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.055>

De Martinis, M., Franceschi, C., Monti, D., & Ginaldi, L. (2005b). Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Letters*, 579(10), 2035–2039. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.055>

de Mol, J., Kuiper, J., Tsiantoulas, D., & Foks, A. C. (2021). The Dynamics of B Cell Aging in Health and Disease. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733566>

Deng M, Zeng Y, Liu Y, Wang X, Chen N, Zhang M, Jiang M, Zhao H, Du J. (2024) Increased PD-1+ NK Cell Subset in the Older Population. *Int J Gen Med.*, 17:651-661. doi: 10.2147/IJGM.S452476.

de Oliveira Fernandes, M. A., Andreão, W. L., Maciel, F. M., & de Almeida Albuquerque, T. T. (2020). Avoiding hospital admissions for respiratory system diseases by complying to the final Brazilian air quality standard: an estimate for Brazilian southeast capitals. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(29), 35889–35907. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07772-x>

Dhodapkar, M. V., & Kumar, V. (2017). Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1015–1021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601399>

Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w>

Dogra, P., Rancan, C., Ma, W., Toth, M., Senda, T., Carpenter, D. J., Kubota, M., Matsumoto, R., Thapa, P., Szabo, P. A., Li Poon, M. M., Li, J., Arakawa-Hoyt, J., Shen, Y., Fong, L., Lanier, L. L., & Farber, D. L. (2020). Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell*, 180(4), 749-763.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.022>

dos Santos, N. V., Vieira, C. L. Z., Saldiva, P. H. N., De André, C. D. S., Mazzilli, B. P., de Fátima Andrade, M., Saueia, C. H., Saiki, M., Veras, M. M., & Koutrakis, P. (2022). Accumulation of trace element content in the lungs of Sao Paulo city residents and its

correlation to lifetime exposure to air pollution. *Scientific Reports*, 12(1), 11083. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15048-2>

Durso, D. F., Silveira-Nunes, G., Coelho, M. M., Camatta, G. C., Ventura, L. H., Nascimento, L. S., Caixeta, F., Cunha, E. H. M., Castelo-Branco, A., Fonseca, D. M., Maioli, T. U., Teixeira-Carvalho, A., Sala, C., Bacalini, M. J., Garagnani, P., Nardini, C., Franceschi, C., & Faria, A. M. C. (2022). Living in endemic area for infectious diseases accelerates epigenetic age. *Mechanisms of Ageing and Development*, 207. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2022.111713>

Fabbri, E., An, Y., Zoli, M., Simonsick, E. M., Guralnik, J. M., Bandinelli, S., Boyd, C. M., & Ferrucci, L. (2015). Aging and the Burden of Multimorbidity: Associations With Inflammatory and Anabolic Hormonal Biomarkers. *The Journals of Gerontology: Series A*, 70(1), 63–70. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu127>

Fernandes Durso, D., Giulia Bacalini, M., Faria Do Valle, Í., Pirazzini, C., Bonafé, M., Castellani, G., Maria, A., Faria, C., Franceschi, C., Garagnani, P., & Nardini, C. (2017). Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 8). www.impactjournals.com/oncotarget/

Fernández-Sanlés, A., Sayols-Baixeras, S., Subirana, I., Sentí, M., Pérez-Fernández, S., de Castro Moura, M., Esteller, M., Marrugat, J., & Elosua, R. (2021). DNA methylation biomarkers of myocardial infarction and cardiovascular disease. *Clinical Epigenetics*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-021-01078-6>

Field, A. E., Robertson, N. A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., & Adams, P. D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. In *Molecular Cell* (Vol. 71, Issue 6, pp. 882–895). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.008>

Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. In *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences* (Vol. 69, pp. S4–S9). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>

Franceschi, C., Capri, M., Monti, D., Giunta, S., Olivieri, F., Sevini, F., Panourgia, M. P., Invidiá, L., Celani, L., Scurti, M., Cevenini, E., Castellani, G. C., & Salvioli, S. (2007). Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(1), 92–105. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>

- Franceschi, C., Salvioli, S., Garagnani, P., de Eguileor, M., Monti, D., & Capri, M. (2017). Immunobiography and the heterogeneity of immune responses in the elderly: A focus on inflammaging and trained immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00982>
- Frasca, D., & Blomberg, B. B. (2020). Aging induces B cell defects and decreased antibody responses to influenza infection and vaccination. *Immunity & Ageing*, 17(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-00210-z>
- Frasca, D., Landin, A. M., Lechner, S. C., Ryan, J. G., Schwartz, R., Riley, R. L., & Blomberg, B. B. (2008). Aging Down-Regulates the Transcription Factor E2A, Activation-Induced Cytidine Deaminase, and Ig Class Switch in Human B Cells. *The Journal of Immunology*, 180(8), 5283–5290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5283>
- Friedman, S. M. (2020). Lifestyle (Medicine) and Healthy Aging. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 36, Issue 4, pp. 645–653). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2020.06.007>
- Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Page, A. Le, Frost, E. H., Cohen, A. A., Witkowski, J. M., & Franceschi, C. (2018). Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: Friends or Foes? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
- Gangemi, S., Basile, G., Monti, D., Merendino, R. A., Pasquale, G. Di, Bisignano, U., Nicita-Mauro, V., & Franceschi, C. (2005). Age-Related Modifications in Circulating IL-15 Levels in Humans. *Mediators of Inflammation*, 2005(4), 245–247. <https://doi.org/10.1155/MI.2005.245>
- García-Serna, A. M., Hernández-Caselles, T., Jiménez-Guerrero, P., Martín-Orozco, E., Pérez-Fernández, V., Cantero-Cano, E., Muñoz-García, M., Ballesteros-Meseguer, C., Pérez de los Cobos, I., García-Marcos, L., Morales, E., & NELA Study Group. (2021). Air pollution from traffic during pregnancy impairs newborn's cord blood immune cells: The NELA cohort. *Environmental Research*, 198, 110468. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110468>
- Gayoso, I., Sanchez-Correa, B., Campos, C., Alonso, C., Pera, A., Casado, J. G., Morgado, S., Tarazona, R., & Solana, R. (2011). Immunosenescence of Human Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity*, 3(4), 337–343. <https://doi.org/10.1159/000328005>

- Gee, K., Guzzo, C., Fazila, N., Mat, C., Ma, W., & Kumar, A. (2009). The IL-12 Family of Cytokines in Infection, Inflammation and Autoimmune Disorders. In *Inflammation & Allergy-Drug Targets* (Vol. 8).
- Ghosh, K., & Capell, B. C. (2016). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: Critical Effector in Skin Cancer and Aging. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 136, Issue 11, pp. 2133–2139). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.06.621>
- Giron, L. B., Liu, Q., Adeniji, O. S., Yin, X., Kannan, T., Ding, J., Lu, D. Y., Langan, S., Zhang, J., Azevedo, J. L. L. C., Li, S. H., Shalygin, S., Azadi, P., Hanna, D. B., Ofotokun, I., Lazar, J., Fischl, M. A., Haberlen, S., Macatangay, B., ... Abdel-Mohsen, M. (2024). Immunoglobulin G N-glycan markers of accelerated biological aging during chronic HIV infection. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47279-4>
- Gomez, C. R., Boehmer, E. D., & Kovacs, E. J. (2005). The aging innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 17(5), 457–462. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.013>
- Gounder, S. S., Abdullah, B. J. J., Radzuanb, N. E. I. B. M., Zain, F. D. B. M., Sait, N. B. M., Chua, C., & Subramani, B. (2018). Effect of Aging on NK Cell Population and Their Proliferation at Ex Vivo Culture Condition. *Analytical Cellular Pathology*, 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/7871814>
- Gubernatorova, E. O., Gorshkova, E. A., Polinova, A. I., & Drutskaya, M. S. (2020). IL-6: Relevance for immunopathology of SARS-CoV-2. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 53, pp. 13–24). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.009>
- Hanlon, P., Nicholl, B. I., Jani, B. D., Lee, D., McQueenie, R., & Mair, F. S. (2018). Frailty and pre-frailty in middle-aged and older adults and its association with multimorbidity and mortality: a prospective analysis of 493 737 UK Biobank participants. *The Lancet Public Health*, 3(7), e323–e332. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(18\)30091-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(18)30091-4)
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Satta, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell*, 49(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.016>
- Hernandez, H., Santamaria-Garcia, H., Moguilner, S., Farina, F. R., Legaz, A., Prado, P., Cuadros, J., Gonzalez, L., Gonzalez-Gomez, R., Migeot, J., Coronel-Oliveros, C., Tagliacruzchi, E., Maito, M. A., Godoy, M. E., Cruzat, J., Shaheen, A., Farombi, T., Salazar, D., Da Ros, L.

U., ... Ibanez, A. (2025). The exposome of healthy and accelerated aging across 40 countries. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03808-2>

Hofstee, M. I., Cevirgel, A., de Zeeuw-Brouwer, M. L., de Rond, L., van der Klis, F., & Buisman, A. M. (2023). Cytomegalovirus and Epstein–Barr virus co-infected young and middle-aged adults can have an aging-related T-cell phenotype. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37502-5>

Holodick, N. E., & Rothstein, T. L. (2015). B cells in the aging immune system: Time to consider B-1 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1362(1), 176–187. <https://doi.org/10.1111/nyas.12825>

Horvath, S., Oshima, J., Martin, G. M., Lu, A. T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Maierhofer, A., Flunkert, J., Aviv, A., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., ... Raj, K. (2018). Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and *ex vivo* studies. *Aging*, 10(7), 1758–1775. <https://doi.org/10.18632/aging.101508>

IBGE. (2010). Índice de Gini. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IBGE. (2012). Poluição em São Paulo. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

IBGE. (2023). Censo demográfico de 2022. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Im, S. J., Hashimoto, M., Gerner, M. Y., Lee, J., Kissick, H. T., Burger, M. C., Shan, Q., Hale, J. S., Lee, J., Nasti, T. H., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., Germain, R. N., Nakaya, H. I., Xue, H.-H., & Ahmed, R. (2016). Defining CD8⁺ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature*, 537(7620), 417–421. <https://doi.org/10.1038/nature19330>

Instituto de Energia e Meio Ambiente. (n.d.). Plataforma Qualidade do Ar. Recuperado em 5 de agosto de 2025, de <https://www.energiaeambiente.org.br/qualidade-do-ar>

Jing, Y., Gravenstein, S., Rao Chaganty, N., Chen, N., Lyerly, K. H., Joyce, S., & Deng, Y. (2007). Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Experimental Gerontology*, 42(8), 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.01.009>

Joller N, Anderson AC, Kuchroo VK (2024) LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. *Immunity*, 57(2):206–222.

Jost, S., & Altfeld, M. (2013). Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100001>

Joubert, B. R., Felix, J. F., Yousefi, P., Bakulski, K. M., Just, A. C., Breton, C., Reese, S. E., Markunas, C. A., Richmond, R. C., Xu, C. J., Küpers, L. K., Oh, S. S., Hoyo, C., Gruziova, O., Söderhäll, C., Salas, L. A., Baiz, N., Zhang, H., Lepeule, J., ... London, S. J. (2016). DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. *American Journal of Human Genetics*, 98(4), 680–696. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.019>

Kang, K., Gilliam, A. C., Chen, G., Tootell, E., & Cooper, K. D. (1998). In human skin, UVB initiates early induction of IL-10 over IL-12 preferentially in the expanding dermal monocytic/macrophagic population. *Journal of Investigative Dermatology*, 111(1), 31–38. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1998.00121.x>

Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SL, Larbi A. (2016) CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 65(4):441-52. doi: 10.1007/s00262-016-1803-z.

Kaszubowska, L., Dettlaff-Pokora, A., Hak, L., Szarynska, M., Ryba, M., Mysliwska, J., & Mysliwski, A. (2008). Successful ageing of nonagenarians is related to the sensitivity of NK cells to activation. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 59 Suppl 9, 187–199. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19261980>

Kennedy, B. K., Berger, S. L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A. M., Epel, E. S., Franceschi, C., Lithgow, G. J., Morimoto, R. I., Pessin, J. E., Rando, T. A., Richardson, A., Schadt, E. E., Wyss-Coray, T., & Sierra, F. (2014). Geroscience: Linking aging to chronic disease. In *Cell* (Vol. 159, Issue 4, pp. 709–713). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.039>

Laphanuwat, P., Gomes, D. C. O., & Akbar, A. N. (2023). Senescent T cells: Beneficial and detrimental roles. *Immunological Reviews*, 316(1), 160–175. <https://doi.org/10.1111/imr.13206>

Lee, K., Shin, K., Kim, G., Song, Y. C., Bae, E., Kim, I., Koh, C., & Kang, C. (2016). Characterization of age-associated exhausted CD8⁺ T cells defined by increased expression of Tim-3 and PD-1. *Aging Cell*, 15(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/acel.12435>

Lehrke, S., Mazhari, R., Durand, D. J., Zheng, M., Bedja, D., Zimmet, J. M., Schuleri, K. H., Chi, A. S., Gabrielson, K. L., & Hare, J. M. (2006). Aging Impairs the Beneficial Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Stem Cell Factor on Post-Myocardial Infarction Remodeling. *Circulation Research*, 99(5), 553–560. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000238375.88582.d8>

Leonardi, G. S., Houthuijs, D., Steerenberg, P. A., Fletcher, T., Armstrong, B., Antova, T., Lochman, I., Lochmanová, A., Rudnai, P., Erdei, E., Musial, J., Jazwiec-Kanyion, B., Niciu, E. M., Durbaca, S., Fabiánová, E., Koppová, K., Lebret, E., Brunekreef, B., & van Loveren, H. (2000). Immune biomarkers in relation to exposure to particulate matter: A cross-sectional survey in 17 cities of Central Europe. *Inhalation Toxicology*, 12(Suppl. 4), 1–14.

Li, H., Ryu, M. H., Orach, J., Yuen, A., Lau, K. S. K., Yeung, C., Wen, W., & Carlsten, C. (2022). Acute air pollution exposure increases TET enzymes in human PBMCs. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 150(2), 477–488.e9. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2022.03.018>

Li, Y., Yin, H., Yuan, H., Wang, E., Wang, C., Li, H., Geng, X., Zhang, Y., & Bai, J. (2024). IL-10 deficiency aggravates cell senescence and accelerates BLM-induced pulmonary fibrosis in aged mice via PTEN/AKT/ERK pathway. *BMC Pulmonary Medicine*, 24(1), 443. <https://doi.org/10.1186/s12890-024-03260-x>

Lima-Silva, M. L., Torres, K. C. L., Mambrini, J. V. de M., Brot, N. C., Santos, S. O., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., Lima-Costa, M. F., & Peixoto, S. V. (2024). A nationwide study on immunosenescence biomarkers profile in older adults: ELSI-Brazil. *Experimental Gerontology*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2024.112433>

Ling, C., & Rönn, T. (2019). Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. In *Cell Metabolism* (Vol. 29, Issue 5, pp. 1028–1044). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.03.009>

Lu, A. T., Seeboth, A., Tsai, P. C., Sun, D., Quach, A., Reiner, A. P., Kooperberg, C., Ferrucci, L., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Harris, S. E., Corley, J., Taylor, A., Deary, I. J., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Chen, W., Li, S., ... Horvath, S. (2019). DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging*, 11(16), 5895–5923. <https://doi.org/10.18632/aging.102173>

Lukyanova, S. O., Artemyeva, O. V., Strazhesko, I. D., Nasaeva, E. D., Grechenko, V. V., & Gankovskaya, L. V. (2024). Expression of TLR2, IL-1 β , and IL-10 Genes as a Possible Factor of Successful or Pathological Aging in Nonagenarians. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 176(4), 505–508. <https://doi.org/10.1007/s10517-024-06056-5>

Maddalon, A., Pierzchalski, A., Krause, J. L., Bauer, M., Finckh, S., Brack, W., Zenclussen, A. C., Marinovich, M., Corsini, E., Krauss, M., & Herberth, G. (2024). Impact of chemical mixtures from wastewater treatment plant effluents on human immune cell activation: An effect-based analysis. *Science of the Total Environment*, 906, 167495. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167495>

Manni, M. L., Trudeau, J. B., Scheller, E. V., Mandalapu, S., Elloso, M. M., Kolls, J. K., Wenzel, S. E., & Alcorn, J. F. (2014). The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. *Mucosal Immunology*, 7(5), 1186–1198. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.8>

Marin, I., Boix, O., Garcia-Garijo, A., Sirois, I., Caballe, A., Zarzuela, E., Ruano, I., Attolini, C. S., Prats, N., López-Domínguez, J. A., Kovatcheva, M., Garralda, E., Muñoz, J., Caron, E., Abad, M., Gros, A., Pietrocola, F., & Serrano, M. (2023). Cellular senescence is immunogenic and promotes antitumor immunity. *Cancer Discovery*, 13(2), 410–431. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-22-0523>

Matthews, N. C., Pfeffer, P. E., Mann, E. H., Kelly, F. J., Corrigan, C. J., Hawrylowicz, C. M., & Lee, T. H. (2016). Urban particulate matter-activated human dendritic cells induce the expansion of potent inflammatory Th1, Th2, and Th17 effector cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(2), 250–262. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0084OC>

Mazzone, R., Zwergel, C., Artico, M., Taurone, S., Ralli, M., Greco, A., & Mai, A. (2019). The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0632-2>

McEwen, L. M., O'Donnell, K. J., McGill, M. G., Edgar, R. D., Jones, M. J., MacIsaac, J. L., Lin, D. T. S., Ramadori, K., Morin, A., Gladish, N., Garg, E., Unternaehrer, E., Pokhvisneva, I., Karnani, N., Kee, M. Z. L., Klengel, T., Adler, N. E., Barr, R. G., Letourneau, N., Giesbrecht, G. F., ... Kober, M. S. (2020). The PedBE clock accurately estimates DNA methylation age in pediatric buccal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(38), 23329–23335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820843116>

- McElhaney, J. E., & Effros, R. B. (2009). Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 21, Issue 4, pp. 418–424). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.023>
- McKenna, R. W., Washington, L. T., Aquino, D. B., Picker, L. J., & Kroft, S. H. (2001). Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. *Blood*, 98(8), 2498–2507. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.8.2498>
- MILLER, J., & CANCRO, M. (2007). B cells and aging: Balancing the homeostatic equation. *Experimental Gerontology*, 42(5), 396–399. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.01.010>
- Mills, K. H. G. (2023). IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 38–54). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>
- Ministério da Saúde. (2022). Razão de mortalidade materna (por 100 mil). Governo Federal do Brasil.
- Ministério da Saúde. (2023). Cobertura de Estratégia Saúde da Família (ESF). Governo Federal do Brasil.
- Mittelbrunn, M., & Kroemer, G. (2021). Hallmarks of T cell aging. *Nature Immunology*, 22(6), 687–698. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00927-z>
- Ogulur, I., Mitamura, Y., Yazici, D., Pat, Y., Ardicli, S., Li, M., D’Avino, P., Beha, C., Babayev, H., Zhao, B., Zeyneloglu, C., Giannelli Viscardi, O., Ardicli, O., Kiykim, A., Garcia-Sanchez, A., Lopez, J.-F., Shi, L., Yang, M., Schneider, S. R., ... Akdis, C. A. (2025). Type 2 immunity in allergic diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 22(3), 211–242. <https://doi.org/10.1038/s41423-025-01261-2>
- OMS. (2013). Limite de poluição do ar. Organização Mundial da Saúde.
- OMS. (2020). *Classificação clínica da COVID-19*. Organização Mundial da Saúde.
- Orange, J. S., & Ballas, Z. K. (2006). Natural killer cells in human health and disease. *Clinical Immunology*, 118(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.10.011>
- Pajulas, A., Zhang, J., & Kaplan, M. H. (2023). The World according to IL-9. *The Journal of Immunology*, 211(1), 7–14. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300094>

- Pauwels, S., Ghosh, M., Duca, R. C., Bekaert, B., Freson, K., Huybrechts, I., Langie, S. A. S., Koppen, G., Devlieger, R., & Godderis, L. (2017). Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clinical Epigenetics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0321-y>
- Pawelec, G. (2014). Immunosenescence: Role of cytomegalovirus. *Experimental Gerontology*, 54, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.010>
- Pelegí-Sisó, D., de Prado, P., Ronkainen, J., Bustamante, M., & González, J. R. (2021). methylclock: a Bioconductor package to estimate DNA methylation age. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(12), 1759–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa825>
- Pellegrini, C., Pirazzini, C., Sala, C., Sambati, L., Yusipov, I., Kalyakulina, A., Ravaioli, F., Kwiatkowska, K. M., Durso, D. F., Ivanchenko, M., Monti, D., Lodi, R., Franceschi, C., Cortelli, P., Garagnani, P., & Bacalini, M. G. (2021). A Meta-Analysis of Brain DNA Methylation Across Sex, Age, and Alzheimer's Disease Points for Accelerated Epigenetic Aging in Neurodegeneration. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.639428>
- Pereira, B. I., & Akbar, A. N. (2016). Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Frontiers in Immunology*, 7(NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00445>
- Pfeffer, P. E., Ho, T. R., Mann, E. H., Kelly, F. J., Sehlstedt, M., Pourazar, J., Dove, R. E., Sandström, T., Mudway, I. S., & Hawrylowicz, C. M. (2018). Urban particulate matter stimulation of human dendritic cells enhances priming of naïve CD8 T lymphocytes. *Immunology*, 153(4), 502–512. <https://doi.org/10.1111/imm.12852>
- Pieren, D. K. J., Smits, N. A. M., Postel, R. J., Kandiah, V., de Wit, J., van Beek, J., van Baarle, D., & Guichelaar, T. (2022). Co-Expression of TIGIT and Helios Marks Immunosenescent CD8+ T Cells During Aging. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833531>
- Pinho-Gomes, A.-C., Roaf, E., Fuller, G., Fowler, D., Lewis, A., ApSimon, H., Noakes, C., Johnstone, P., & Holgate, S. (2023). Air pollution and climate change. *The Lancet Planetary Health*, 7(9), e727–e728. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00189-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00189-4)
- Plusquin, M., Guida, F., Polidoro, S., Vermeulen, R., Raaschou-Nielsen, O., Campanella, G., Hoek, G., Kyrtopoulos, S. A., Georgiadis, P., Naccarati, A., Sacerdote, C., Krogh, V., Bas Bueno-de-Mesquita, H., Monique Verschuren, W. M., Sayols-Baixeras, S., Panni, T., Peters, A.,

Hebels, D. G. A. J., Kleinjans, J., ... Chadeau-Hyam, M. (2017). DNA methylation and exposure to ambient air pollution in two prospective cohorts. *Environment International*, 108, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.08.006>

Pope, C. A., III, Bhatnagar, A., McCracken, J. P., Abplanalp, W., Conklin, D. J., & O'Toole, T. (2016). Exposure to fine particulate air pollution is associated with endothelial injury and systemic inflammation. *Circulation Research*, 119(11), 1204–1214. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309279>

PNUD/IBGE. (2010). Expectativa de vida (anos). Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Pu, F., Chen, W., Li, C., Fu, J., Gao, W., Ma, C., Cao, X., Zhang, L., Hao, M., Zhou, J., Huang, R., Ma, Y., Hu, K., & Liu, Z. (2024). Heterogeneous associations of multiplexed environmental factors and multidimensional aging metrics. *Nature Communications*, 15(1), 4921. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49283-0>

Quinn, L. S., Anderson, B. G., Drivdahl, R. H., Alvarez, B., & Argilés, J. M. (2002). Overexpression of Interleukin-15 Induces Skeletal Muscle Hypertrophy in Vitro: Implications for Treatment of Muscle Wasting Disorders. *Experimental Cell Research*, 280(1), 55–63. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5624>

Quinn, L. S., Anderson, B. G., Strait-Bodey, L., Stroud, A. M., & Argilés, J. M. (2009). Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(1), E191–E202. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90506.2008>

Racine, R., McLaughlin, M., Jones, D. D., Wittmer, S. T., MacNamara, K. C., Woodland, D. L., & Winslow, G. M. (2011). IgM Production by Bone Marrow Plasmablasts Contributes to Long-Term Protection against Intracellular Bacterial Infection. *The Journal of Immunology*, 186(2), 1011–1021. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002836>

Radaev, S., Rostro, B., Brooks, A. G., Colonna, M., & Sun, P. D. (2001). Conformational Plasticity Revealed by the Cocrystal Structure of NKG2D and Its Class I MHC-like Ligand ULBP3. *Immunity*, 15(6), 1039–1049. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00241-2](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00241-2)

Ramos, G. C. (2012). Inflammation as an animal development phenomenon. In *Clinical and Developmental Immunology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/983203>

- Raqib, R., Akhtar, E., Sultana, T., Ahmed, S., Chowdhury, M. A. H., Shahriar, M. H., Kader, S. B., Eunus, M., Haq, M. A., Sarwar, G., Islam, T., Alam, D. S., Parvez, F., Begum, B. A., Ahsan, H., & Yunus, M. (2022). Association of household air pollution with cellular and humoral immune responses among women in rural Bangladesh. *Environmental Pollution*, 299, 118892. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.118892>
- Ribeiro, L. C. de Q., & Lago, L. C. do. (2000). O espaço social das grandes metrópoles brasileiras: São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte. *Revista Brasileira de Estudos Urbanos e Regionais*, 3, 111. <https://doi.org/10.22296/2317-1529.2000n3p111>
- Romagnani, S. (1996a). TH1 and TH2 in Human Diseases. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 80(3), 225–235. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.0118>
- Romagnani, S. (1996b). Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends in Microbiology*, 4(12), 470–473. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)82906-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)82906-X)
- Santoro, A., Bientinesi, E., & Monti, D. (2021). Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? In *Ageing Research Reviews* (Vol. 71). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101422>
- Sanz, I., Wei, C., Lee, F. E.-H., & Anolik, J. (2008). Phenotypic and functional heterogeneity of human memory B cells. *Seminars in Immunology*, 20(1), 67–82. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.006>
- Scharer, C. D., Patterson, D. G., Mi, T., Price, M. J., Hicks, S. L., & Boss, J. M. (2020). Antibody-secreting cell destiny emerges during the initial stages of B-cell activation. *Nature Communications*, 11(1), 3989. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17798-x>
- Solana, R., Alonso, M. C., & Peña, J. (1999). Natural killer cells in healthy aging. In *Experimental Gerontology* (Vol. 34).
- Speziali, E., Bethony, J., Martins-Filho, O., Fraga, L. A. O., Lemos, D. S., Souza, L. J., Correa-Oliveira, R., & Faria, A. M. C. (2004). Production of interferon- γ by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation*, 13(5–6), 327–333. <https://doi.org/10.1080/09629350400008802>
- Stabile, H., Carlino, C., Mazza, C., Giliani, S., Morrone, S., Notarangelo, L. D., Notarangelo, L. D., Santoni, A., & Gismondi, A. (2010). Impaired NK-cell migration in WAS/XLT patients:

role of Cdc42/WASp pathway in the control of chemokine-induced $\beta 2$ integrin high-affinity state. *Blood*, 115(14), 2818–2826. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235804>

Suryadevara, V., Hudgins, A. D., Rajesh, A., Pappalardo, A., Karpova, A., Dey, A. K., Hertz, A., Agudelo, A., Rocha, A., Soygur, B., Schilling, B., Carver, C. M., Aguayo-Mazzucato, C., Baker, D. J., Bernlohr, D. A., Jurk, D., Mangarova, D. B., Quardokus, E. M., Enninga, E. A. L., ... Neretti, N. (2024). SenNet recommendations for detecting senescent cells in different tissues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(12), 1001–1023. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00738-8>

Tarazona, R., DelaRosa, O., Alonso, C., Ostos, B., Espejo, J., Peña, J., & Solana, R. (2001). Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 121(1–3), 77–88. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(00\)00199-8](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(00)00199-8)

TILLIE-LEBLOND, I., HAMMAD, H., DESURMONT, S., PUGIN, J., WALLAERT, B., TONNEL, A.-B., & GOSSET, P. (2000). CC Chemokines and Interleukin-5 in Bronchial Lavage Fluid from Patients with Status Asthmaticus. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(2), 586–592. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.2.9907014>

Toledo, G. I. F. M. de, & Nardocci, A. C. (2011). Poluição veicular e saúde da população: uma revisão sobre o município de São Paulo (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 14(3), 445–454. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2011000300009>

Turner, D. C., Gorski, P. P., Maasar, M. F., Seaborne, R. A., Baumert, P., Brown, A. D., Kitchen, M. O., Erskine, R. M., Dos-Remedios, I., Voisin, S., Eynon, N., Sultanov, R. I., Borisov, O. V., Larin, A. K., Semenova, E. A., Popov, D. V., Generozov, E. V., Stewart, C. E., Drust, B., ... Sharples, A. P. (2020). DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72730-z>

Veneri, D., Franchini, M., Vella, A., Tridente, G., Semenzato, G., Pizzolo, G., & Ortolani, R. (2007). Changes of human B and B-1a peripheral blood lymphocytes with age. *Hematology*, 12(4), 337–341. <https://doi.org/10.1080/10245330701255270>

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>

Wang, B., Han, J., Elisseeff, J. H., & Demaria, M. (2024). The senescence-associated secretory phenotype and its physiological and pathological implications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(12), 958–978. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00727-x>

Wang, X., Wong, K., Ouyang, W., & Rutz, S. (2019). Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028548>

Wei, C., Anolik, J., Cappione, A., Zheng, B., Pugh-Bernard, A., Brooks, J., Lee, E.-H., Milner, E. C. B., & Sanz, I. (2007). A New Population of Cells Lacking Expression of CD27 Represents a Notable Component of the B Cell Memory Compartment in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 178(10), 6624–6633. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6624>

Weksler, M. E., & Szabo, P. (2000). The Effect of Age on the B-Cell Repertoire. *Journal of Clinical Immunology*, 20(4), 240–249. <https://doi.org/10.1023/A:1006659401385>

Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 12(6), 492–499. <https://doi.org/10.1038/ni.2035>

Wolach, B., van der Laan, L. J. W., Maianski, N. A., Tool, A. T. J., van Bruggen, R., Roos, D., & Kuijpers, T. W. (2007). Growth factors G-CSF and GM-CSF differentially preserve chemotaxis of neutrophils aging in vitro. *Experimental Hematology*, 35(4), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.12.008>

Woods, T., Palmarini, N., Corner, L., Barzilai, N., Maier, A. B., Sagner, M., Bensch, J., Strygin, A., Yadala, N., Kern, C., Ward, P., Ferrucci, L., Bischof, E. Y., Barker, R., Shiels, P. G., Guiot, G., Monti, J., Justice, J., Kennedy, B. K., & Furman, D. (2025). Cities, communities and clinics can be testbeds for human exposome and aging research. In *Nature Medicine*. *Nature Research*. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03519-8>

Yang, C., Siebert, J. R., Burns, R., Gerbec, Z. J., Bonacci, B., Rymaszewski, A., Rau, M., Riese, M. J., Rao, S., Carlson, K.-S., Routes, J. M., Verbsky, J. W., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2019). Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome. *Nature Communications*, 10(1), 3931. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11947-7>

Yazdi, A. S., & Ghoreschi, K. (2016). The interleukin-1 family. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 941, pp. 21–29). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_2

Yusipov, I., Kalyakulina, A., Trukhanov, A., Franceschi, C., & Ivanchenko, M. (2024). Map of epigenetic age acceleration: A worldwide analysis. *Ageing Research Reviews*, 100, 102418. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2024.102418>

Zhang, L., Xu, F., Yang, Y., Yang, L., Wu, Q., Sun, H., An, Z., Li, J., Wu, H., Song, J., & Wu, W. (2024). PM_{2.5} exposure upregulates pro-inflammatory protein expression in human microglial cells via oxidant stress and TLR4/NF- κ B pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 277, 116386. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116386>

Zhang, X.-X., Guo, X.-K., & Zhou, X.-N. (2025). One Health: a key element in the WHO Pandemic Agreement. *The Lancet*, 405(10496), 2197–2198. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(25\)01118-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(25)01118-3)

Zhou, J., Zhu, S., Zhang, Y., Xie, F., Liu, B., Yuan, L., Liu, X., Sun, D., & Wei, W. (2025). Low-dose fluoride exposure disrupts CD4⁺ T cell balance in humans and rats. *Environmental Research*, 285(Pt 3), 122482. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.122482>

Zhou, X., Sampath, V., & Nadeau, K. C. (2024). Effect of air pollution on asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 132(4), 426–432. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2024.01.017>

Zingoni, A., Molfetta, R., Fionda, C., Soriani, A., Paolini, R., Cippitelli, M., Cerboni, C., & Santoni, A. (2018). NKG2D and Its Ligands: “One for All, All for One.” *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00476>

Zinsstag, J., Schelling, E., Waltner-Toews, D., & Tanner, M. (2011). From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. *Preventive Veterinary Medicine*, 101(3–4), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.07.003>

Anexo 1: Script usado para análise com o pacote WateRmelon**# carregar pacotes**

```
library(minfi)
```

```
library(wateRmelon)
```

#importar dados

```
mlumi <- readEPIC('C:/Users/Monique/Desktop/arquivos IDAT')
```

```
dim(mlumi)
```

Filtragem de qualidade usando limites padrão

```
mlumi.pf <- pfilter(mlumi)
```

Normalizar dos dados

```
mlumi.dasen.pf <- dasen(mlumi.pf)
```

#Extrair Betas para análise downstream

```
norm_betas <- betas(mlumi.dasen.pf)
```

detectar outliers

```
outliers <- outlyx(mlumi, plot=TRUE)
```

```
print(outliers)
```

remover outliers

```
mlumi[,!outliers$out]
```

```
bsc <- bscon(mlumi)
```

```
hist(bsc, xlab = c(0, 100))
```

#filtrar

```
mlumi.pf <- pfilter(mlumi)
```

#normalizar dados novamente

```
dasen.mlumi <- dasen(mlumi)
```

```
das <- dasen(mlumi)

qu <- qual(betas(mlumi), betas(das))

plot(qu[,1], qu[,2])

bet <- betas(mlumi)

pwod_bet <- pwod(bet)

# salvar dados

write.csv(pwod_bet, file = "beta.csv")

write.table(pwod_bet,file="beta.txt")
```

Anexo 2: Script usado para análise com o pacote Methylock

```
# carregar pacotes

library(methylock)

library(methylockData)

library(Biobase)

library(tibble)

library(impute)

library(ggplot2)

library(ggpmisc)

library(GEOquery)

library(tidyverse)

#identificar pasta de trabalho

setwd("C:/Users/Monique/Desktop/dados R")

#carregar arquivos de trabalho

beta = as.data.frame(read.csv("beta.csv"))
```

#normalizar dados

```
cpgs.missing <- checkClocks(beta)
```

```
cpgs.missing.GA <- checkClocksGA(beta)
```

```
names(cpgs.missing)
```

#gerar a idade epigenética

```
DNAmAge = DNAmAge(beta, cell.count = TRUE)
```

#salvar idade epigenética

```
write.csv2(DNAmAge, file = "IdadeEpigenetica1.csv")
```

#calcular a aceleração

```
covariates <- read_csv("SampleSheet.csv")
```

```
covariates
```

```
beta[is.na(beta)] <- 0
```

```
age <- covariates$Chronological_age
```

```
head(age)
```

```
age.acc <- DNAmAge(beta, age=age, cell.count=TRUE)
```

#salvar dados de aceleração

```
write.csv2(age.acc, file = "AceleraIdade.csv")
```

#plotar gráficos de dispersão dos relógios

```
plotCorClocks(age.acc)
```



OPEN ACCESS

EDITED BY

Sylviane Pied,
Centre National de la Recherche Scientifique
(CNRS), France

REVIEWED BY

Luz Pamela Blanco,
National Institutes of Health (NIH),
United States
Matthew Yousefzadeh,
Columbia University, United States

*CORRESPONDENCE

Ana Maria Caetano Faria
✉ anacaetanofaria@gmail.com

RECEIVED 18 December 2024

ACCEPTED 24 February 2025

PUBLISHED 17 March 2025

CITATION

Coelho MM, Moreira FC, Zuccherato LW,
Ventura LHdA, Camatta GC,
Starling-Soares B, Torres L, Durso DF,
Sato HI, da Costa MS, Guimarães HC,
Barbuto RC, Júnior MLO, Speziali E,
Tupinambas U, Teixeira SMR,
Silveira-Nunes G, Teixeira-Carvalho A,
Maioli TU and Faria AMC (2025)
Living in endemic area for infectious
diseases is associated to differences
in immunosenescence and
inflammatory signatures.
Front. Immunol. 16:1547854.
doi: 10.3389/fimmu.2025.1547854

COPYRIGHT

© 2025 Coelho, Moreira, Zuccherato, Ventura,
Camatta, Starling-Soares, Torres, Durso, Sato,
da Costa, Guimarães, Barbuto, Júnior, Speziali,
Tupinambas, Teixeira, Silveira-Nunes,
Teixeira-Carvalho, Maioli and Faria. This is an
open-access article distributed under the terms
of the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction
in other forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original publication
in this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Living in endemic area for infectious diseases is associated to differences in immunosenescence and inflammatory signatures

Monique Macedo Coelho¹, Felipe Caixeta Moreira¹,
Luciana Werneck Zuccherato¹,
Lucas Haniel de Araújo Ventura¹, Giovanna Caliman Camatta¹,
Bernardo Starling-Soares¹, Lícia Torres¹,
Danielle Fernandes Durso¹, Hugo Itaru Sato¹,
Murilo Soares da Costa², Henrique Cerqueira Guimarães³,
Rafael Calvão Barbuto³, Mauro Lúcio O. Júnior⁴,
Elaine Speziali^{5,6}, Unaí Tupinambas²,
Santuzza Maria Ribeiro Teixeira¹, Gabriela Silveira-Nunes⁷,
Andrea Teixeira-Carvalho⁵, Tatiani Uceli Maioli^{1,8}
and Ana Maria Caetano Faria^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³Hospital Risoleta Tolentino Neves, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Hospital da UNIMED, Governador Valadares, Brazil, ⁵Instituto de Pesquisa René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil, ⁶Universidade Edson Antônio Velano, Fundação de Ensino e Tecnologia de Alfenas, Belo Horizonte, Brazil, ⁷Departamento de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares, Brazil, ⁸Departamento de Nutrição, Escola de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Research on aged individuals from developed countries show that lifestyle factors such as diet, physical activity, stress, smoking, and sleep quality impact aging. However, other relevant factors may influence aging in less-studied populations, such as Brazilian cohorts. This study aimed to analyze immunosenescence profile of individuals living in an endemic area for several infectious diseases in Brazil. We showed that these individuals exhibited accelerated epigenetic aging and increased production of IL-12p70, IL-17A, and IL-9. Production of inflammatory mediators IL-12p70, IL-6, IL-1 β , IL-2, and IL-1ra in individuals with flu-like symptoms and those with COVID-19 was higher among residents in endemic areas than in residents from a control non-endemic area. Furthermore, residents of the endemic area had a more prominent inflammatory profile during viral infection and a different pattern of plasma mediators when compared to residents of a non-endemic area. Our data suggests that these two cohorts had specific immune signatures regardless of the presence or the type of infection at study. Therefore, we demonstrated that

there were distinct patterns of immune responses and epigenetic aging depending on the environment the individuals live in. These observations add a layer of diversity to the studies of human aging by including individuals from less represented regions.

KEYWORDS

endemic area, infectious diseases, immunosenescence, epigenetic clocks, environment

Introduction

Aging is a multifactorial and heterogeneous biological phenomenon that affects individuals in diverse ways (1). Lifestyle factors, such as nutritional habits, physical activity, well-being, stress, smoking, and sleep quality, significantly influence the aging process (2, 3).

Aging affects all body compartments, and the immune system is one of the most affected. Immunological changes occurring during aging, which are collectively called immunosenescence, are associated with increased susceptibility to infections due to the progressive decline in immune function (4, 5). This process involves thymic involution with decreased production of naïve T cells, increased frequency of memory T cells, reduction in T cell repertoire and the accumulation of senescent and exhausted lymphocytes in the periphery (6). Immunosenescence also includes a chronic state of low-grade inflammation, termed “inflammaging,” characterized by alterations in the levels of plasma mediators such as IL-6, TNF- α , IL-1, and IL-10 (7, 8). Inflammaging is a systemic consequence of various aging-related events, including epigenetic changes, mitochondrial dysfunction, genomic instability, and the emergence of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) by senescent cells (6).

Senescent T lymphocytes are cells that have undergone permanent cell cycle arrest, accumulate molecular damage, exhibit dysregulated metabolism, and produce senescence-associated mediators, in addition to expressing markers such as CD57 and TIGIT. These cells also lose essential co-stimulatory molecules, such as CD28 and CD27 (9). On the other hand, exhausted T lymphocytes are characterized by the expression of inhibitory co-receptors, such as PD-1, LAG-3, and TIM-3. They exhibit low proliferative capacity and reduced cytokine production (10). Furthermore, there is a decrease in the production of naïve B lymphocytes, accompanied by the accumulation of oligoclonally expanded cells (11).

Despite their dysfunctional phenotype, Grosse and colleagues demonstrated that senescent cells play important physiological roles, and their elimination could lead to health deterioration and a shorter lifespan in mice due to the disruption of blood-tissue barriers (12). Moreover, not all aged individuals suffer from chronic inflammatory diseases and frailty. Studies on healthy nonagenarians and centenarians in Italy and in healthy elderly people in Brazil showed

that these individuals develop remodeling mechanisms that control the deleterious effects of inflammation and immunosenescence (13–16).

Therefore, aging does not lead to a linear and universal decline in immune function. Immune remodeling mechanisms developed by some individuals allow them to adapt to the deleterious effects of immunosenescence (7). Studies conducted by our group showed that elderly individuals residing in endemic areas for schistosomiasis, but not infected (negative), develop innate immune protection mechanisms that compensate for the age-associated decline in T cell function (17, 18). One of these studies showed that the frequency of IFN- γ -producing NK cells increases with aging and remains elevated in individuals over 70 years old (17). In another study, we observed an increase in the frequency of NK cells expressing Toll-like receptors TLR-1, -2, -3, and -4, as well as dendritic cells expressing TLR-1 and monocytes expressing TLR-1 and -4 (18). These findings suggest that compensation of the innate immune response may play a key role in resistance to infection and healthy aging in individuals residing in endemic areas.

However, we also reported that the enhanced innate responses triggered by continuous antigenic stimuli in these individuals from endemic areas may lead to accelerated senescence measured by methylation of CpG islands in the DNA (19).

DNA methylation is one of several mechanisms that regulate gene expression and is considered an important biomarker of aging. Based on methylation status, epigenetic clocks have been developed to calculate individuals' biological age. These clocks can detect not only the acceleration of aging but also the effects of deceleration in models of healthy aging (20). Moreover, DNA methylation patterns are associated with a wide range of age-related diseases, including Alzheimer's (21), cardiovascular diseases (22), and cancer (23). Age acceleration measured by methylation patterns are known to be altered in response to environmental stimuli such as exercise (24), diet (25), smoking (26), and pollutants (27). One study demonstrated that an eight-week treatment program, including diet, sleep, exercise, relaxation techniques, and probiotic supplementation, was able to reduce the epigenetic age of a group of 43 adult men by 3.23 years (28).

Herein, we examined aging in an endemic area (EA) in Brazil, where the prevalence of schistosomiasis, leishmaniasis, leprosy and viral infections is high. This study was conducted based on two points of departure. First, immunosenescence has been known as a

consequence of chronic antigenic exposure (29), but there is no detailed evaluation of the immunological repercussions in the immunosenescence profile of individuals residing in EAs compared to those living in non-endemic areas (NEAs). Second, as mentioned before, previous reports by our group showed that healthy aging in such endemic areas are achieved at the cost of augmented innate immune responses that provide resistance to infectious agents (17, 18).

Traditionally aging studies focuses on cohorts and issues associated with developed countries and Caucasian populations. Our hypothesis is that, in addition to lifestyle, other significant environmental factors such as chronic exposure to infectious agents may be associated with distinct patterns of immunosenescence and aging. Therefore, in this study, we aimed to evaluate the immunological repercussions in a cohort of individuals residing in an endemic area for infectious diseases in Brazil.

Materials and methods

Ethics statement

This study meticulously adhered to the ethical standards set forth by National Research Ethics Committee (CONEP), prioritizing the safety and well-being of all participants. It was approved by Human Research Ethical Board of UFMG (CEP-UFMG) and the National Research Ethics Committee (CONEP) (CAAE # 40208320.3.1001.5149). All volunteers were informed of the objectives and procedures involved in the study and they signed the Informed Consent Form (TCLE) before their voluntary participation.

Study subjects

The research was conducted in two distinct Brazilian cities: one living in a non-endemic area for infectious diseases (Belo Horizonte/MG), where 107 participants were enlisted, and another in an endemic region (Governador Valadares/MG), also with 107 participants. This amassed a cohort of 214 individuals, whose attributes are shown in Table 1.

Volunteer recruitment spanned from December 2020 to October 2021, focusing on identifying individuals displaying symptoms akin to flu-like syndromes of unknown origin (Flu-like syndrome) and COVID-19, alongside including individuals in good health (control group). Throughout the collection period, circulating strains of COVID-19 encompassed both the original variant and P1. All chosen volunteers underwent an RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) test to validate the diagnosis of COVID-19. Volunteers were recruited at UPA-Centro Sul and Hospital Universitário Risoleta Tolentino Neves in Belo Horizonte and Hospital Unimed in Governador Valadares.

The study's inclusion criteria involved recruiting adult or elderly volunteers aged 20 years old or above, irrespective of whether they exhibited flu-like symptoms, provided they consented to sign the Informed Consent Form (TCLE). The participant selection process also adhered to specific exclusion criteria, excluding children and adolescents (under 18 years old), individuals with inconclusive results in the RT-PCR test for COVID-19 detection, flu-like symptoms persisting beyond 9 days, and individuals living with HIV.

The body mass index (BMI) of the participants was categorized based on the following criteria: less than 18.5 (underweight), between 18.5 and 24.9 (normal weight), between 25.0 and 29.9 (overweight), and exceeding 30.0 (obesity).

TABLE 1 Characterization of the study sample.

	AE (endemic area)			NEA (non-endemic area)		
	Flu- Like n = 45	COVID-19 n = 47	Negative Control n = 15	Flu- Like n = 45	COVID-19 n = 47	Negative Control n = 15
Age (years)	38 (18-60)	38,5 (18-77)	41 (19-78)	36 (19-63)	40,5 (18-76)	39 (18-65)
Sex Female (%)	51,1	46,8	46,7	46,6	53,19	53,3
Sex Male (%)	48,9	54,2	53,3	53,4	46,80	46,6
BMI (Kg/m ²)	28,3 ± 5,57	26,29 ± 4,53	26 ± 4,21	28,4 ± 7	30 ± 5,67	27 ± 6,82
Viral Load (ct)	–	21,89 ± 7,12	–	–	27,3 ± 5,14	–
Comorbidity (%)	28,8	23,4	20	24,4	23,4	26,6
Hipertension (n)	9	6	2	6	6	3
Diabetes Miellitus (n)	3	3	0	4	3	1
Respiratory Disease (n)	0	2	1	1	0	0
Others (n)	1	0	0	0	2	0

NEA- non-endemic area; EA- endemic area; NC- negative control; FS- flu syndrome; BMI – body mass index calculated by the formula kg/m² where kg is a person's weight in kilograms and m² is their height in squared meters.

The volunteers were engaged by the study team in health units where they reviewed and addressed any queries regarding the Informed Consent Form (ICF), they underwent a clinical and sociodemographic questionnaire session and had their blood samples collected for serum and plasma separation, alongside swab collection for SARS-CoV-2 detection via RT-PCR. Individuals diagnosed with COVID-19 were telemonitored for 14 days following confirmation and delivery of the RT-PCR test results.

Luminex-multiplex measurement of inflammatory mediators

To assess blood mediators, we utilized heparinized plasma from our volunteers, employing the Bio-Plex[®] Pro Human Cytokine Standard multiplex kit by Bio-Rad Laboratories. This kit facilitates the simultaneous analysis of numerous analytes through magnetic immunoassay, conducted on Luminex equipment (Bio-Plex[®] 200, Bio-Rad). The quantified panel of analytes encompasses IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, CCL11, FGF-Basic, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, PDGF-BB, CCL5, TNF- α , and VEGF. Analyses was conducted utilizing the Bioplex[™] xPONENT software version 3.1 by Bio-Rad.

Radar plots

The radar chart depicted cytokines/chemokines categorized as low (\leq global median) and high (\geq global median) producers, utilizing the global median of each mediator as a cut-off (30). The calculation of the global median encompassed the entire dataset derived from the respective groups. Within the radar, each axis symbolizes individuals exhibiting elevated levels of a specific mediator (termed high producers). These axes interconnect to form a polygonal area, illustrating the equilibrium between growth factors, inflammatory, and anti-inflammatory mediators. An increase or decrease in this area signifies a higher or lower contribution of each mediator to the overall profile.

DNA extraction and bisulphite treatment

Genomic DNA extraction was conducted from peripheral whole blood samples using the Trizol and Chloroform protocol. Subsequently, 1 μ g of DNA underwent bisulfite conversion utilizing the EZ-96 DNA Methylation Kit (Zymo Research, Irvine, USA) with specific adjustments: incubation in CT buffer for 21 cycles of 15 minutes at 55°C and 30 seconds at 95°C, followed by elution of the bisulfite-treated DNA in 100 μ l of water. Post-extraction and conversion, the samples were loaded onto the Illumina Infinium Methylation EPIC Bead Chip. Fluorescence data were collected from all enrolled subjects, and subsequent beta values were calculated.

Estimation of DNAm age

Following the acquisition of the methylation beta value matrices file, we utilized the methylclock 1.5.0 package (31) to estimate biological ages and aging acceleration through nine distinct methylation clocks.

Serology

Serological analysis was carried out on individuals from EA (Governador Valadares, Brazil) and from NEA (Belo Horizonte, Brazil) to detect IgG antibodies against the dengue virus and cytomegalovirus (CMV). All examinations were outsourced to the Hermes Pardini Laboratory in Belo Horizonte, Brazil, adhering to the institution's protocols for detection techniques, sample transportation, and storage methods. Dengue serology employed Enzyme Immunoassay, facilitating the quantitative detection of specific IgG for all dengue serotypes (DEN1, 2, 3, and 4). CMV testing utilized the ELFA (Fluorimetry Enzyme Assay) technique, allowing the quantitative detection of IgG antibodies specific to CMV types 1 and 2 antigens.

Spearman's correlation analysis

Spearman's coefficient analysis was performed using the R package to assess multiple associations between biomarkers and determine the strength of relationships. The correlation coefficient value ranges from -1 to +1, where a positive value indicates changes in the same direction and a negative value indicates opposite directions. A value of 0 signifies no association between variables. The correlation plot displays only those correlations with $p < 0.05$. Circle size represents statistical significance, with larger circles denoting lower p-values and increased significance.

Statistical analysis

The significance of differences between groups was assessed through parametric tests (Student's t-test and analysis of variance – ANOVA, followed by Tukey's post-test) or non-parametric tests (Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's post-test). The normality of sample distribution was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. Participant characteristics were presented as mean (standard deviation) or median (minimum to maximum range) for continuous variables and as frequency (number) for categorical variables. When appropriate, means (standard deviation) or medians (interquartile range) were depicted in graphs. All statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 8.0 package, considering a difference as significant when $p < 0.05$.

Results

Individuals residing in endemic areas had accelerated epigenetic aging

A previous report conducted by our group described that individuals living in an area endemic for infectious diseases had accelerated biological age measured by DNA methylation (19). This study included volunteers from Governador Valadares, MG, an endemic area (EA), and individuals from São Paulo, SP, a non-endemic area (NEA). In this study, we also compared the epigenetic aging of the volunteers from another city, Belo Horizonte, MG, as a NEA sample. Epigenetic analyses indicated that individuals living in EA also exhibited accelerated aging compared to those living in NEAs across the six biological clocks evaluated: skinHovarth (Figure 1A), PedBE (Figure 1B), Wu (Figure 1C), TL (Figure 1D), BLUP (Figure 1E), and EN (Figure 1F).

Individuals residing in endemic areas for infectious diseases presented higher production of IL-12p70, IL-17A, and IL-9

Since aging can lead to various alterations in the immune response (6), we investigated the immune repercussions in the production of inflammatory mediators in our cohort. Residents in EA had higher production of IL-12p70 (Figure 2A), IL-17A (Figure 2B), and IL-9 (Figure 2C) compared to individuals living in NEA. On the other hand, residents in NEA showed higher production of IL-6 (Figure 2D), IL-1 β (Figure 2E), IL-2 (Figure 2F), IL-1ra (Figure 2G), and IL-10 (Figure 2H). Additionally, individuals residing in EA presented a less homogeneous profile and a higher frequency of high producers of PDGF-BB, VEGF, CXCL11, IL-9, IL-12p70, and IL-17A compared to NEA residents (Figure 2I, J).

Notably, more than 60% of these individuals tested positive for CMV and 80% were reactive to Dengue virus as opposed to individuals from a non-endemic area where only 6% of individuals were positive for CMV and Dengue infections (Table 2).

Individuals from endemic area with either flu-like symptoms or COVID-19 had higher production of plasma mediators

Alterations in immune activity associated with aging can increase vulnerability to infectious diseases (32). In this study, we explored putative differences in the production of inflammatory mediators in response to viral infections between the two cohorts. Participants from endemic areas for infectious diseases (EA) were compared to those from non-endemic areas (NEA) who exhibited either flu-like symptoms or COVID-19. Individuals with either flu-like symptoms or infected with COVID-19 residing in EA exhibited higher production of IL-12p70 (Figure 3A), IL-6 (Figure 3B), IL-1 β (Figure 3C), IL-2 (Figure 3D), and IL-1ra (Figure 3E) compared to

NEA residents. Additionally, EA individuals with COVID-19 showed increased production of IL-10 compared to NEA individuals (Figure 3F).

High producer profile of individuals residing in endemic areas versus non-endemic areas

In addition to the differences found in cytokine production, we observed that these individuals exhibited a higher frequency of high producers of inflammatory mediators, anti-inflammatory mediators, chemokines, and growth factors compared to NEA residents, both with flu-like syndromes (Figure 4A, B) and COVID-19 (Figure 4C, D). Furthermore, the inflammatory profile of individuals residing in EA is very similar to the profile of individuals residing in NEA regardless of the type of infection, (Figure 4C, D).

Individuals residing in endemic area had distinct correlations among inflammatory mediators and epigenetic age

Aging is accompanied by a state of low-grade chronic inflammation, known as “inflammaging” (6, 7, 33). Since individuals residing in EA exhibit accelerated aging and possess a distinct profile in the production of inflammatory mediators compared to NEA residents, we aimed to understand the biomarkers associated with the biological aging of these individuals by comparing correlation matrices. The correlogram of individuals living in EA showed more intense positive correlations among inflammatory mediators than the correlogram of individuals living in NEA (Figure 5A, B). Furthermore, epigenetic age is positively correlated, in increasing order, with CXCL8, CCL5, CCL4, IL-5, CCL3, TNF α , IL-17A, CXCL11, IL-9, IL-6, bFGF, CXCL10, G-CSF, IL-7, CCL2, IL-4, VEGF, and GM-CSF in EA volunteers, while in NEA volunteers, epigenetic age is positively correlated, in increasing order, with IL17A, CCL2, IL-4, IL-10, CXCL11, IL-12p70, IL-7, CCL5, and IL-9 (Figure 5D).

Discussion

Environmental factors, such as lifestyle, can play a crucial role in promoting healthy aging. While chronological aging progresses at a fixed rate, the rate of biological aging varies among individuals. Biological age can be measured by epigenetic clocks, which are based on DNA methylation patterns (20).

To understand whether frequent exposure to infectious antigens leads to accelerated aging, we used six epigenetic clocks to compare the aging of individuals residing in an EA with those in a NEA. Our results showed that individuals in the EA exhibit accelerated epigenetic aging across all evaluated methylation clocks

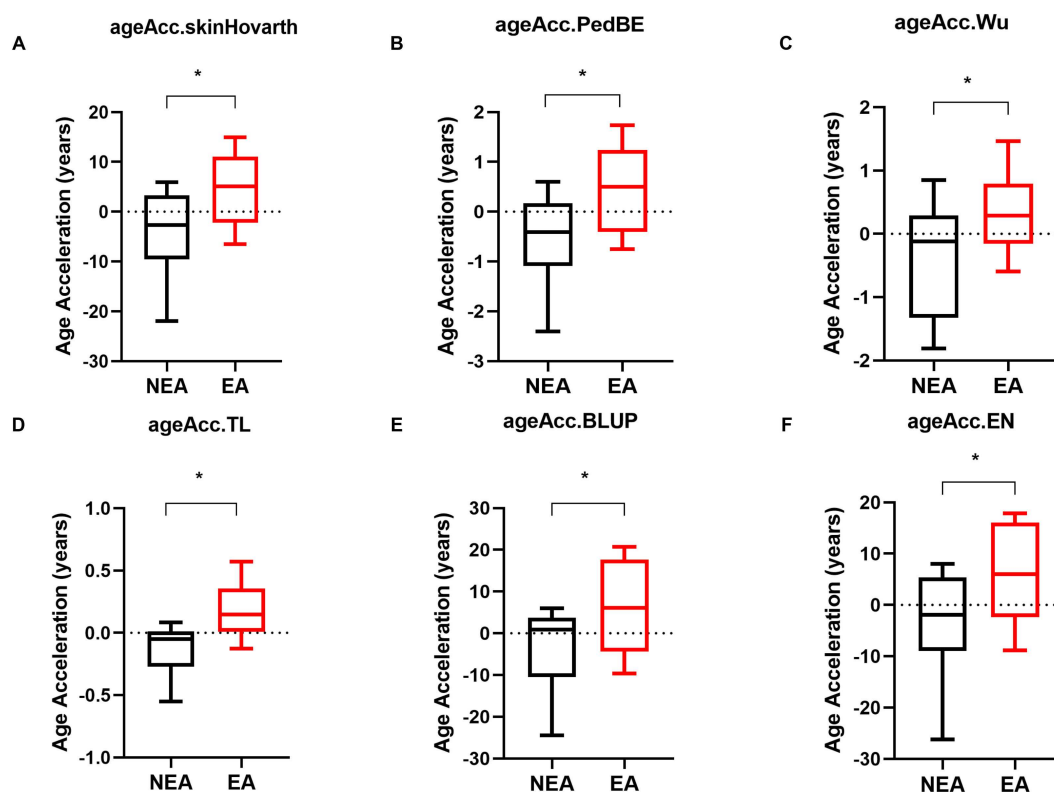


FIGURE 1

Individuals residing in EA exhibit accelerated epigenetic aging compared to those in NEA. (A-F) Acceleration of biological aging in individuals residing in NEA represented by black boxplots ($n=11$) compared to individuals residing in EA represented by red boxplots ($n=11$). The skinHovarth, PedBE, Wu, TL, BLUP, and EN clocks from the methylclock 1.5.0 package of the R software were utilized. The unpaired t-test was conducted. * $p \geq 0.05$.

(Figure 1A-F). These findings are consistent with results from a previously published study by our group, despite using a cohort from a different NEA (19).

Among the various modifications associated with aging and immunosenescence, one of the most prominent is the “inflammaging” phenomenon characterized by the increased systemic production of IL-1, IL-6, and TNF- α (6). In this study, differently from the previous one, we examined the production of inflammatory mediators in two cohorts of individuals and found that residents in EA had increased production of IL-12p70 (Figure 2A), IL-17A (Figure 2B), and IL-9 (Figure 2C). In contrast, individuals residing in the NEA showed higher production of IL-6 (Figure 2D), IL-1 β (Figure 2E), IL-1ra (Figure 2F), IL-2 (Figure 2G), and IL-10 (Figure 2H).

Although our results indicate higher production of IL-6 (Figure 2D) and IL-1 β (Figure 2E) in NEA residents—cytokines typically associated with *inflammaging* - it is important to note that the volunteers in both groups were age-matched. Furthermore, this study does not focus on a cohort of elderly individuals but rather on two cohorts with distinct biological aging profiles. Moreover, aging is a continuous process that occurs throughout life, beginning at birth.

IL-12 consists of the p35 and p40 subunits, which combine to form the bioactive IL-12p70. This cytokine is crucial for IFN- γ

production and the activation of Th1 cells (34). IL-17A, on the other hand, is primarily produced by Th17 cells in response to IL-1 β and IL-23, mediating immunity against fungi and bacteria (35). IL-9 is a pleiotropic cytokine produced by Th2 cells, ILC2s, mast cells, and basophils, playing a significant role in type 2 immunity, autoimmunity, and the immune response to tumors (36). IL-6 is an acute-phase pro-inflammatory cytokine secreted primarily by macrophages, important for regulating inflammatory disorders such as viral infections (37, 38). IL-1 β , also produced by macrophages, is cleaved by inflammasome activation, which is triggered by caspase-1. Besides protecting against pathogens, this cytokine regulates sterile insults and plays a crucial role in proliferation, differentiation, and apoptosis (39). Conversely, IL-1ra acts as a natural inhibitor of IL- β by serving as an antagonist of the interleukin-1 receptor (40). Increased production of IL-1ra is probably a regulatory response to control the elevated secretion of IL-1 β . IL-10 also exerts potent immunosuppressive functions (41). On the other hand, IL-2 can have opposing functions playing a significant role in both inflammation and suppression. It is involved in the proliferation of T cells, facilitating the generation of effector and memory cells, and in the maintenance of regulatory T cells (42).

In response to immunogenic challenges, the immune response typically polarizes towards Th1, Th2, or Th17 pathways. Interestingly, our data revealed a lack of polarization in the

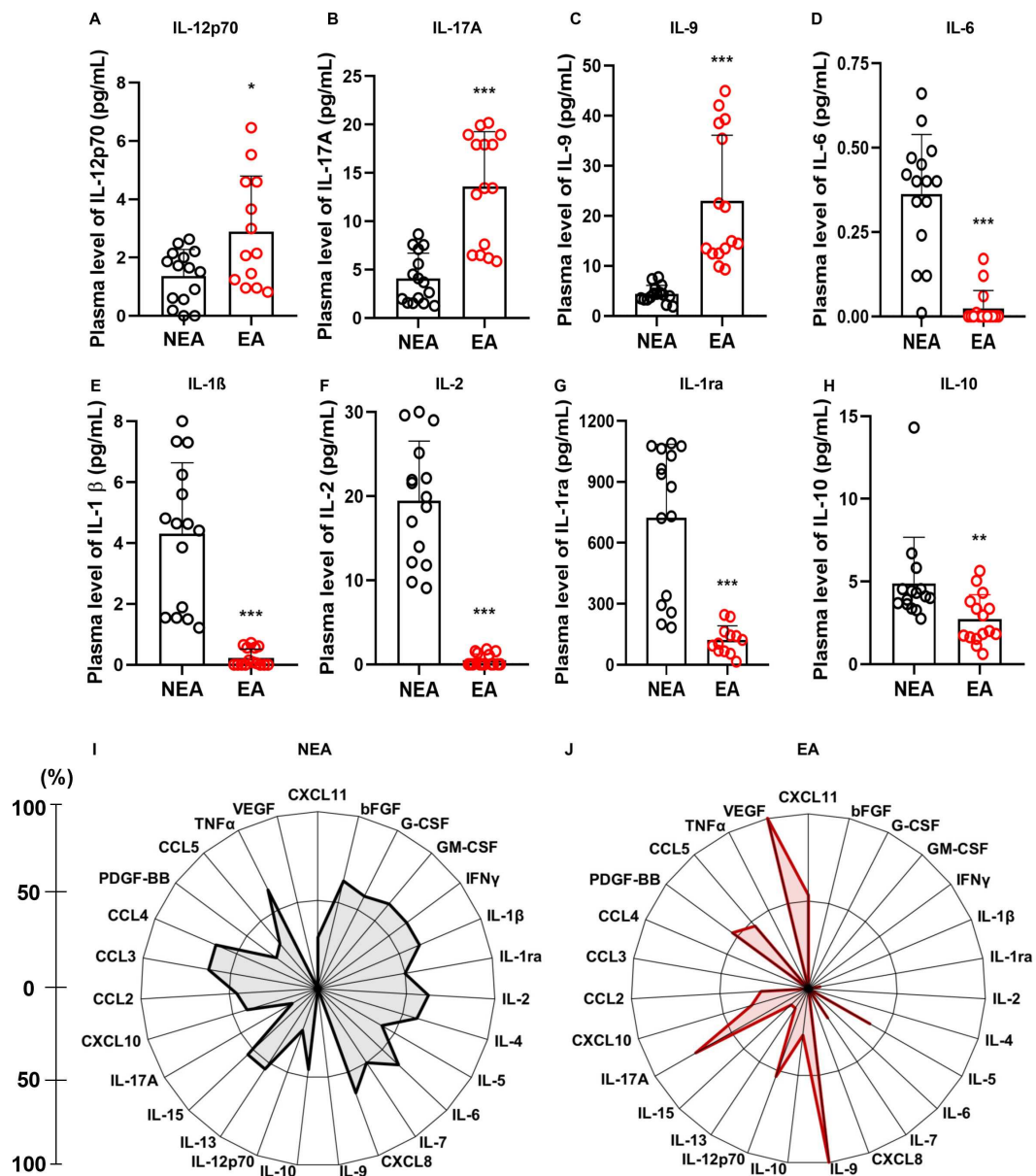


FIGURE 2 Individuals residing in EA exhibit differences in inflammatory mediators: (A) Comparison of IL-12p70 production, (B) IL-17A, (C) IL-9, (D) IL-6, (E) IL-1β, (F) IL-2, (G) IL-1ra, and (H) IL-10 production between individuals residing in NEA (black bars, n=15) and those residing in EA (red bars, n=15). (I) Radar plot illustrating the production of inflammatory mediators in individuals residing in NEA (n=15). (J) Radar plot representing the production of inflammatory mediators in individuals residing in EA (n=15). In the radar plots, each axis represents the percentage (%) of volunteers exhibiting a high frequency of inflammatory mediator production, as indicated by the line on the left. The central polygonal area reflects the overall profile of each group. Inflammatory mediator production was assessed using the Luminex assay. Statistical differences were determined using the Mann-Whitney test, with significance denoted as * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$.

TABLE 2 Prevalence of CMV and Dengue infections among negative control (NC) individuals residing in the NEA and EA based on serological analysis.

	Negative control individuals residing in NEA (n=15)	Negative control individuals residing in EA (n=15)
CMV	6%	66,6%
Dengue	6%	80%

profile of mediators from individuals residing in EA with elevated levels of inflammatory cytokines associated with diverse immune functions. In contrast, the panel of mediators produced by individuals in NEA was more balanced, with elevated production of both early inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokines. This suggests that at steady state individuals residing in endemic areas had an immunological inflammatory profile very distinct from the one exhibited by individuals from non-endemic areas.

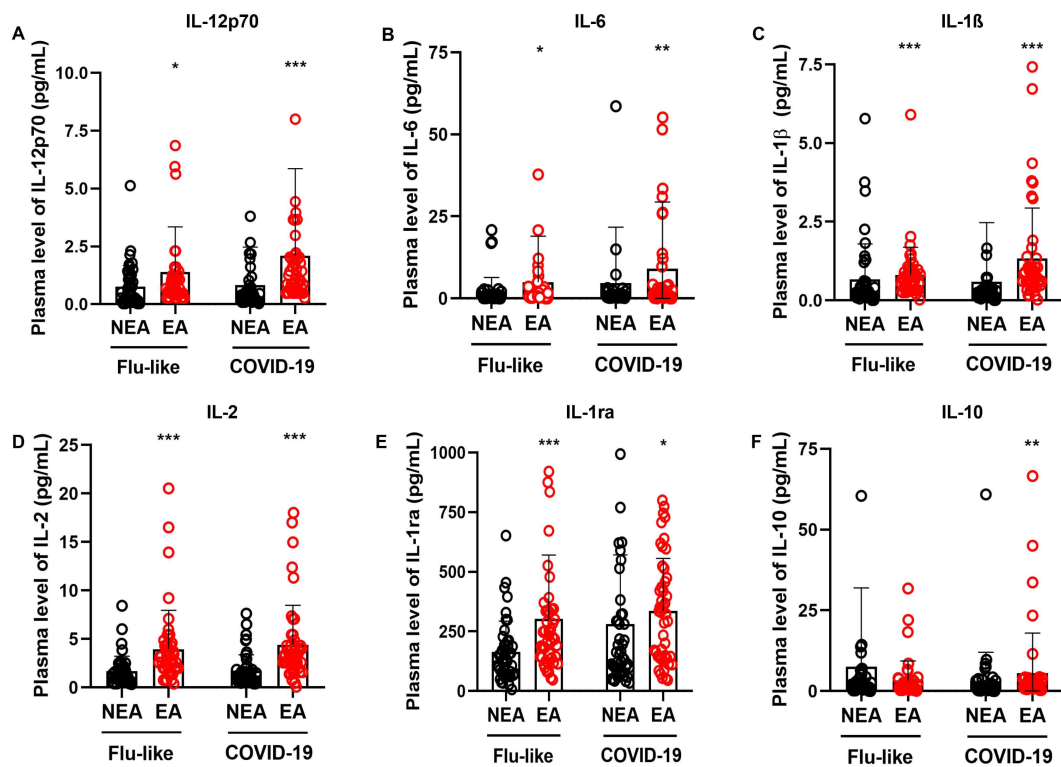


FIGURE 3

Individuals with flu-like symptoms or COVID-19 residing in EA exhibit higher production of inflammatory mediators. (A) Comparison of IL12-p70 production, (B) IL-6, (C) IL-1 β , (D) IL-2, (E) IL-1ra, and (F) IL-10 in individuals with flu-like symptoms (n = 45) or COVID-19 (n = 47), residing in NEA, depicted by black bars, and individuals residing in EA, depicted by red bars. The production of inflammatory mediators was assessed using a Luminex assay. The Mann-Whitney test was conducted, and statistical differences were denoted by * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$.

Inflammation is a natural process that plays a crucial role in various functions, including embryogenesis and tissue repair (43). A balanced profile of immune response is considered a marker of health since chronic inflammation is detrimental and can contribute to biological aging, as observed in studies of individuals infected with CMV (44), autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus (45), and conditions like obesity or type 2 diabetes (46). Despite the differences observed in the production of inflammatory mediators between the groups, their inflammatory status remained subclinical, and no symptom was reported. Moreover, participants in both groups do not exhibit significant comorbidities or differences in age or sex (Table 1). However, more than 60% of these individuals test positive for CMV infection and 80% for dengue infection in serological assays (Table 2). It is likely that these infections influence the inflammatory profile of EA individuals (47).

It is known that changes in immune activity associated with aging can increase vulnerability to diseases (9, 32, 48). Therefore, we also investigated whether individuals residing in endemic areas exhibited differences in the production of inflammatory mediators in response to viral infections. We compared residents of EA with those in NEA who had flu-like symptoms or were diagnosed with mild COVID-19 according to the World Health Organization (WHO, 2020) classification criteria.

Residents of EA with COVID-19 and FLS had higher production of IL-12p70, IL-6, IL-1 β , IL-2, and IL-1ra compared to residents of NEA (Figures 3A-E), as well as an increased production of IL-10 in COVID-19 patients (Figure 3F). Additionally, these individuals showed a greater frequency of high producers of cytokines, chemokines, and growth factors, compared to those in NEA, both among those with flu-like symptoms (Figures 2A, B) and those with COVID-19 (Figures 2C, D).

Therefore, individuals residing in EA not only responded more intensely to infections than those in NEA, but they also produced a distinctive panel of mediators during these responses. We hypothesize that this may be due to a combination of an immunosenescent inflammatory profile, characteristic of those exposed to multiple infections throughout life (Figure 2), and their response to the viral antigens they encountered at the time of the study. A previous report supports this hypothesis, as it demonstrated that even young adults co-infected with cytomegalovirus and Epstein-Barr virus already had an aging-related T cell phenotype (49).

One of the most significant changes associated with aging is the emergence of cells with reduced activity and proliferative capacity, along with a senescence-associated secretory phenotype (SASP). These cells produce inflammatory cytokines and play a role in the inflammatory process (33, 50). Lifelong exposure to infectious

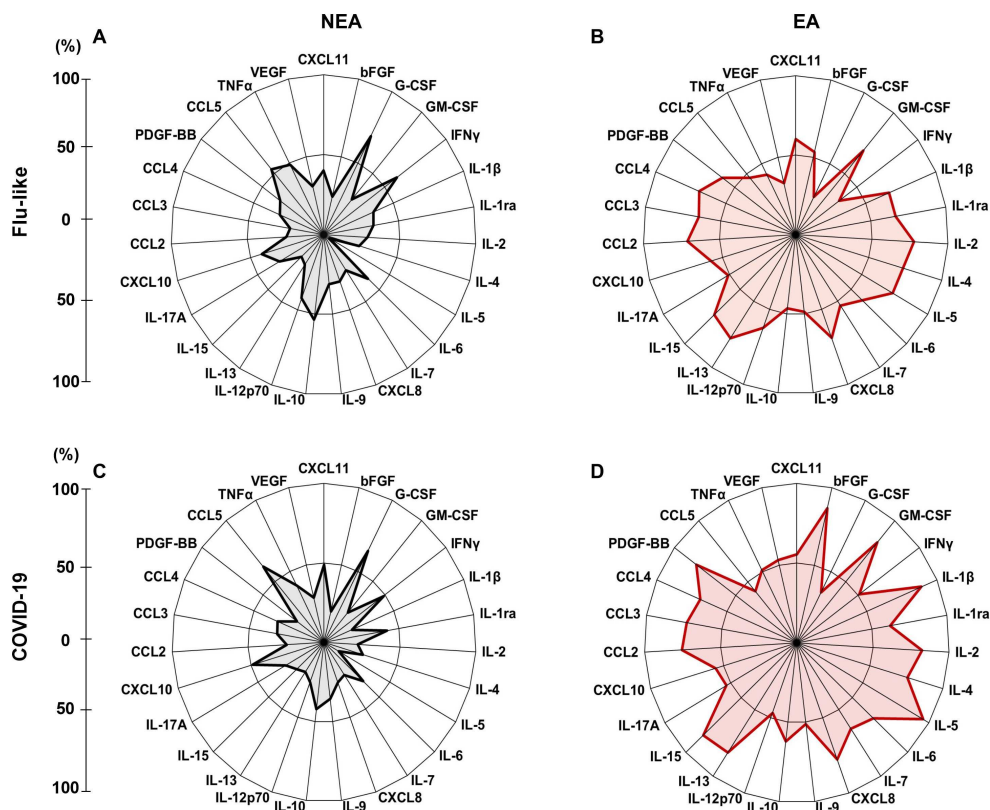


FIGURE 4

Infected individuals residing in EA exhibit a elevated frequency of high producers of inflammatory mediators: (A) Radar plot illustrating the production of inflammatory mediators in individuals with flu-like symptoms residing in NEA ($n = 45$). (B) Radar plot representing the production of inflammatory mediators in individuals with flu-like symptoms residing in EA ($n = 45$). (C) Radar plot showing inflammatory mediator production in individuals with COVID-19 residing in NEA ($n = 47$). (D) Radar plot displaying inflammatory mediator production in individuals with COVID-19 residing in EA ($n = 47$). In the radar plots, each axis represents the percentage (%) of volunteers exhibiting a high frequency of inflammatory mediator production, as indicated by the line on the left. The central polygonal area reflects the overall profile of each group. Inflammatory mediator production was assessed using the Luminex assay.

antigens promotes chronic activation of the immune system, contributing to the emergence of senescent T cells, which are part of the SASP and accompany the aging process (51). Additionally, exhausted T cells also accumulate with age. These cells are characterized by the expression of inhibitory receptors and a reduced capacity to produce cytokines, along with impaired effector function after encountering an antigen (10). These cellular phenotypes are associated with compromised immune responses to vaccination, increased frailty, and greater susceptibility to age-related diseases (50).

Additionally, our results showed that although individuals with COVID-19 residing in EA produced higher levels of mediators compared to those with flu-like symptoms (Figures 4C, D), the inflammatory profile of EA residents was very similar regardless of the type of infection they carry (Figures 4B, D). The same was true for residents in NEA (Figures 4A, C).

These results lead us to believe that environmental differences, triggered by local stressors, were associated not only with varying

rates of biological aging but also with distinct immunological profiles at steady state and during viral infectious diseases.

To understand whether there are differences in aging-associated inflammatory mediators between individuals from EA and those from NEA, we correlated three epigenetic clocks with the production of inflammatory mediators. The correlation matrix for individuals living in EA showed a greater number of positive correlations and stronger correlations among inflammatory mediators compared to the correlogram for individuals in NEA (Figures 5A, B).

Additionally, epigenetic age was positively correlated, in descending order, with CXCL8, CCL5, CCL4, IL-5, CCL3, TNF- α , IL-17A, CXCL11, IL-9, IL-6, bFGF, CXCL10, G-CSF, IL-7, CCL2, IL-4, VEGF, and GM-CSF among EA volunteers (Figure 5D). In contrast, for NEA volunteers, epigenetic age was positively correlated, in descending order, with IL-17A, CCL2, IL-4, IL-10, CXCL11, IL-12p70, IL-7, CCL5, and IL-9 (Figure 5C).

It has been proposed that aging is not characterized solely by deleterious changes and functional decline, but it includes a

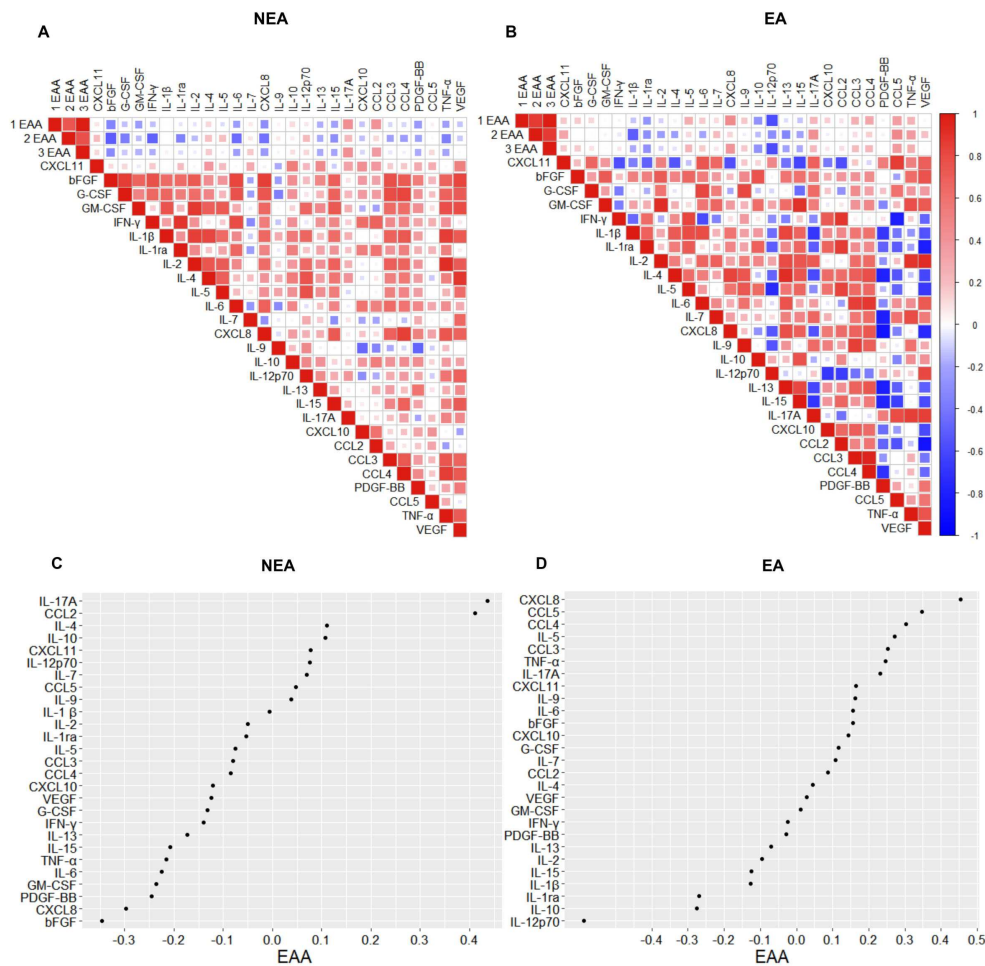


FIGURE 5 Individuals residing in EA exhibit distinct correlations of immunological phenotypes associated with epigenetic aging. **(A)** Spearman correlograms depicting plasma cytokines, chemokines, and growth factors correlation with the acceleration of biological aging (1EAA= skinHovarth, 2EAA= PedBE, and 3EAA= BLUP) in individuals residing in NEA and **(B)** EA (n = 11). The intensity of the correlation between two variables is represented by the color of the square at their intersection, ranging from bright red (strong positive correlation; i.e., $r_2 = 1.0$) to bright blue (strong negative correlation; i.e., $r_2 = -1.0$). **(C)** Spearman correlogram between the acceleration of biological aging (EAA= skinHovarth) and the production of cytokines, chemokines, and plasma growth factors in individuals residing in NEA and **(D)** EA (n = 11). The display shows NEA correlations from 0.4 to -0.3 and EA from 0.5 to -0.5. Data represent p-values ≤ 0.05 for statistical analysis conducted between groups.

remodeling process to cope with challenges that occurs throughout life (6–8, 52). In this sense, aging involves compensatory changes resulting from the immunological history of individuals. Our data on the immunological and biological age of individuals who are residents of EA and NEA confirm this hypothesis.

Several studies indicate that aging can be accelerated by various lifestyle factors, such as processed foods and poor quality (2). In this study, we added a layer of complexity to these findings demonstrating that living in endemic areas for infectious disease may also impact on the immunological profile of individuals and in their aging process. Continuous exposure to strong antigenic stimulation is probably determinant for these differences, and they may be an important

factor for the aging process of populations from many regions of the world, not only Brazil. Therefore, these data are relevant for a more universal understanding of immunosenescence and for the design of strategies to promote healthy aging.

The present study had limitations. Although the samples were matched for sex, age, and comorbidities, the sample size was small, particularly in the groups of individuals who did not exhibit flu-like symptoms and tested negative for COVID-19. Furthermore, immunophenotyping to assess senescent and exhausted cells would be crucial for a better understanding of the immunosenescent profile of these individuals. These factors highlight the need for future studies with larger sample sizes to confirm the findings.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary materials. Further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Comitê de Ética em Pesquisa (UFMG) and Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), Brazil. The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. The participants provided their written informed consent to participate in this study. Written informed consent was obtained from the individual(s) for the publication of any potentially identifiable images or data included in this article.

Author contributions

MC: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. FM: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. LZ: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. LV: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing – original draft. GC: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. BS: Formal Analysis, Methodology, Writing – original draft. LT: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. DD: Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Writing – review & editing. HS: Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. Md: Formal Analysis, Methodology, Writing – review & editing. HG: Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. RB: Data curation, Formal Analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. MJ: Data curation, Formal Analysis, Validation, Writing – review & editing. ES: Methodology, Validation, Writing – review & editing. UT: Formal Analysis, Validation, Writing – review & editing. ST: Formal Analysis, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. GS: Data curation, Methodology, Validation, Writing – review & editing. AT: Data curation, Formal Analysis, Methodology, Validation, Writing – review & editing. TM: Formal Analysis, Investigation, Validation, Writing – review & editing. AF:

Conceptualization, Data curation, Formal Analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research and/or publication of this article. This study was supported by grants from Merck Sharp & Dohme Investigator Initiated Studies Program (MISP#60383), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, # 407363/2021-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (# 0688/2020, CAPES, Brazil), and Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG). MoC, TM, AF, GC, ST are recipients of research fellowships and scholarships from CNPq and LT are recipients of scholarships and fellowships from CAPES, Brazil, FM is recipient of a scholarship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

- Cohen AA, Legault V, Fülöp T. What if there's no such thing as "aging"? *Mech Ageing Dev.* (2020) 192:111344. doi: 10.1016/j.mad.2020.111344
- Friedman SM. Lifestyle (Medicine) and healthy aging. *Clin Geriatr Med.* (2020) 36:645–53. doi: 10.1016/j.cger.2020.06.007
- Bloomberg M, Muniz-Terrera G, Brocklebank L, Steptoe A. Healthy lifestyle and cognitive decline in middle-aged and older adults residing in 14 European countries. *Nat Commun.* (2024) 15:5003. doi: 10.1038/s41467-024-49262-5
- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: Linking aging to chronic disease. *Cell.* (2014) 159:709–13. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.039
- Hanlon P, Nicholl BI, Jani BD, Lee D, McQueenie R, Mair FS. Frailty and pre-frailty in middle-aged and older adults and its association with multimorbidity and mortality: a prospective analysis of 493 737 UK Biobank participants. *Lancet Public Health.* (2018) 3:e323–32. doi: 10.1016/S2468-2667(18)30091-4

6. Ajoalabady A, Pratico D, Tang D, Zhou S, Franceschi C, Ren J. Immunosenescence and inflammaging: Mechanisms and role in diseases. *Ageing Res Rev.* (2024) 101:102540. doi: 10.1016/j.arr.2024.102540
7. Fulop T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, et al. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front Immunol.* (2018) 8:1960. doi: 10.3389/fimmu.2017.01960
8. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* (2007) 128:92–105. doi: 10.1016/j.mad.2006.11.016
9. McElhaney JE, Effros RB. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? *Curr Opin Immunol.* (2009) 21:418–24. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.023
10. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* (2011) 12:492–9. doi: 10.1038/ni.2035
11. de Mol J, Kuiper J, Tsiantoulas D, Foks AC. The dynamics of B cell aging in health and disease. *Front Immunol.* (2021) 12:733566. doi: 10.3389/fimmu.2021.733566
12. Grosse L, Wagner N, Emelyanov A, Molina C, Lacas-Gervais S, Wagner K-D, et al. Defined p16High senescent cell types are indispensable for mouse healthspan. *Cell Metab.* (2020) 32:87–99.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2020.05.002
13. Santoro A, Bientinesi E, Monti D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev.* (2021) 71:101422. doi: 10.1016/j.arr.2021.101422
14. Caruso C, Accardi G, Aiello A, Calabrò A, Ligotti ME, Candore G. Lessons from Sicilian centenarians for anti-ageing medicine. The Oxi-inflammation status. *Transl Med UniSa.* (2022) 24:16–23. doi: 10.37825/2239-9747.1036
15. Caetano Faria AM, Monteiro de Moraes S, Ferreira de Freitas LH, Speziali E, Figueiredo Soares T, Pretti-Figueiredo-Neves S, et al. Variation rhythms of lymphocyte subsets during healthy aging. *Neuroimmunomodulation.* (2008) 15:365–79. doi: 10.1159/000156478
16. Lima-Silva ML, Torres KCL, Mambrini Jv de M, Brot NC, Santos SO, Martins-Filho OA, et al. A nationwide study on immunosenescence biomarkers profile in older adults: ELSI-Brazil. *Exp Gerontol.* (2024) 191:112433. doi: 10.1016/j.exger.2024.112433
17. Speziali E, Bethony J, Martins-Filho O, Fraga LAO, Lemos DS, Souza LJ, et al. Production of interferon- γ by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators Inflammation.* (2004) 13:327–33. doi: 10.1080/09629350400008802
18. Comin F, Speziali E, Martins-Filho OA, Caldas IR, Moura V, Gazzinelli A, et al. Ageing and Toll-like receptor expression by innate immune cells in chronic human schistosomiasis. *Clin Exp Immunol.* (2007) 149:274–84. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03403.x
19. Durso DF, Silveira-Nunes G, Coelho MM, Camatta GC, Ventura LH, Nascimento LS, et al. Living in endemic area for infectious diseases accelerates epigenetic age. *Mech Ageing Dev.* (2022) 207:111713. doi: 10.1016/j.mad.2022.111713
20. Field AE, Robertson NA, Wang T, Havas A, Ideker T, Adams PD. DNA methylation clocks in aging: categories, causes, and consequences. *Mol Cell.* (2018) 71:882–95. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.008
21. Pellegrini C, Pirazzini C, Sala C, Sambati L, Yusipov I, Kalyakulina A, et al. A meta-analysis of brain DNA methylation across sex, age, and alzheimer's disease points for accelerated epigenetic aging in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci.* (2021) 13:639428. doi: 10.3389/fnagi.2021.639428
22. Fernández-Sanlés A, Sayols-Baixeras S, Subirana I, Sentí M, Pérez-Fernández S, de Castro Moura M, et al. DNA methylation biomarkers of myocardial infarction and cardiovascular disease. *Clin Epigenet.* (2021) 13:86. doi: 10.1186/s13148-021-01078-6
23. Durso DF, Bacalini MG, do Valle ÍF, Pirazzini C, Bonafé M, Castellani G, et al. Aberrant methylation patterns in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* (2017) 8:12820–30. doi: 10.18632/oncotarget.14590
24. Turner DC, Gorski PP, Maasar MF, Seaborne RA, Baumert P, Brown AD, et al. DNA methylation across the genome in aged human skeletal muscle tissue and muscle-derived cells: the role of HOX genes and physical activity. *Sci Rep.* (2020) 10:15360. doi: 10.1038/s41598-020-72730-z
25. Pauwels S, Ghosh M, Duca RC, Bekaert B, Freson K, Huybrechts I, et al. Maternal intake of methyl-group donors affects DNA methylation of metabolic genes in infants. *Clin Epigenet.* (2017) 9:16. doi: 10.1186/s13148-017-0321-y
26. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, et al. DNA methylation in newborns and maternal smoking in pregnancy: genome-wide consortium meta-analysis. *Am J Hum Genet.* (2016) 98:680–96. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.02.019
27. Plusquin M, Guida F, Polidoro S, Vermeulen R, Raaschou-Nielsen O, Campanella G, et al. DNA methylation and exposure to ambient air pollution in two prospective cohorts. *Environ Int.* (2017) 108:127–36. doi: 10.1016/j.envint.2017.08.006
28. Fitzgerald KN, Hodges R, Hanes D, Stack E, Cheishvili D, Szyf M, et al. Potential reversal of epigenetic age using a diet and lifestyle intervention: a pilot randomized clinical trial. *Aging.* (2021) 13:9419–32. doi: 10.18632/aging.202913
29. De Martinis M, Franceschi C, Monti D, Ginaldi L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. *FEBS Lett.* (2005) 579:2035–9. doi: 10.1016/j.febslet.2005.02.055
30. Silveira-Nunes G, Speziali E, Teixeira-Carvalho A, Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Figueiredo-Soares T, et al. Lifewide profile of cytokine production by innate and adaptive immune cells from Brazilian individuals. *Immun Ageing.* (2017) 14. doi: 10.1186/s12979-017-0084-5
31. Pelegi-Siso D, De Prado P, Ronkainen J, Bustamante M, Gonzalez JR. Methylclock: A Bioconductor package to estimate DNA methylation age methylclock: A Bioconductor package to estimate DNA methylation age. *Bioinformatics.* (2021) 37:1759–60. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa825
32. Bernabeu-Wittel M, Ternero-Vega JE, Díaz-Jiménez P, Conde-Guzmán C, Nieto-Martín MD, Moreno-Gaviño L, et al. Death risk stratification in elderly patients with covid-19. A comparative cohort study in nursing homes outbreaks. *Arch Gerontol Geriatr.* (2020) 91:104240. doi: 10.1016/j.archger.2020.104240
33. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* (2014) 69:S4–9. doi: 10.1093/gerona/glu057
34. Gee K, Guzzo C, Che Mat N, Ma W, Kumar A. The IL-12 family of cytokines in infection, inflammation and autoimmune disorders. *Inflammation Allergy-Drug Targets.* (2009) 8:40–52. doi: 10.2174/187152809787582507
35. Mills KHG. IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nat Rev Immunol.* (2023) 23:38–54. doi: 10.1038/s41577-022-00746-9
36. Pajulas A, Zhang J, Kaplan MH. The world according to IL-9. *J Immunol.* (2023) 211:7–14. doi: 10.4049/jimmunol.2300094
37. Gubernatorova EO, Gorshkova EA, Polinova AI, Drutskaya MS. IL-6: relevance for immunopathology of SARS-coV-2. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2020) 53:13–24. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.009
38. Aliyu M, Zohora FT, Anka AU, Ali K, Maleknia S, Saffarioun M, et al. Interleukin-6 cytokine: An overview of the immune regulation, immune dysregulation, and therapeutic approach. *Int Immunopharmacol.* (2022) 111:109130. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109130
39. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 beta—A friend or foe in Malignancies? *Int J Mol Sci.* (2018) 19. doi: 10.3390/ijms19082155
40. Yazdi AS, Ghoreschi K. The interleukin-1 family. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, New York LLC (2016). p. 21–9. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_2
41. Wang X, Wong K, Ouyang W, Rutz S. Targeting IL-10 family cytokines for the treatment of human diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2019) 11:a028548. doi: 10.1101/cshperspect.a028548
42. Abbas AK, Trotta E R, Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol.* (2018) 3:1482. doi: 10.1126/sciimmunol.aat1482
43. Ramos GC. Inflammation as an animal development phenomenon. *Clin Dev Immunol.* (2012) 2012:1–8. doi: 10.1155/2012/983203
44. Giron LB, Liu Q, Adeniji OS, Yin X, Kannan T, Ding J, et al. Immunoglobulin G N-glycan markers of accelerated biological aging during chronic HIV infection. *Nat Commun.* (2024) 15:3035. doi: 10.1038/s41467-024-47279-4
45. Mazzone R, Zwergel C, Artico M, Taurone S, Ralli M, Greco A, et al. The emerging role of epigenetics in human autoimmune disorders. *Clin Epigenet.* (2019) 11:34. doi: 10.1186/s13148-019-0632-2
46. Ling C, Rönn T. Epigenetics in human obesity and type 2 diabetes. *Cell Metab.* (2019) 29:1028–44. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.009
47. Pawelec G. Immunosenescence: role of cytomegalovirus. *Exp Gerontol.* (2014) 54:1–5. doi: 10.1016/j.exger.2013.11.010
48. Chung J-Y, Hsu C-C, Chen J-H, Chen W-L, Lin H-J, Guo H-R, et al. Geriatric influenza death (GID) score: a new tool for predicting mortality in older people with influenza in the emergency department. *Sci Rep.* (2018) 8:9312. doi: 10.1038/s41598-018-27694-6
49. Hofstee MI, Cevirgel A, de-Zeeuw-Brouwer M-L, de Rond L, van der Klis F, Buisman A-M. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus co-infected young and middle-aged adults can have an aging-related T-cell phenotype. *Sci Rep.* (2023) 13:10912. doi: 10.1038/s41598-023-37502-5
50. Ghosh K, Capell BC. The senescence-associated secretory phenotype: critical effector in skin cancer and aging. *J Invest Dermatol.* (2016) 136:2133–9. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.621
51. Chambers ES, Akbar AN. Can blocking inflammation enhance immunity during aging? *J Allergy Clin Immunol.* (2020) 145:1323–31. doi: 10.1016/j.jaci.2020.03.016
52. Raffington L. Utilizing epigenetics to study the shared nature of development and biological aging across the lifespan. *NPJ Sci Learn.* (2024) 9:24. doi: 10.1038/s41539-024-00239-5