

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Patrícia Lavandoski

Papel da eotaxina-1/ CCL11 na indução de senescência celular em fibroblastos pulmonares e a relação entre inflamação sistêmica e ansiedade no contexto da asma

Porto Alegre

2024

Patrícia Lavandoski

Papel da eotaxina-1/ CCL11 na indução de senescência celular em fibroblastos pulmonares e a relação entre inflamação sistêmica e ansiedade no contexto da asma

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Coorientador(a): Prof^a Dr^a Florencia María Barbé-Tuana

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Lavandoski, Patrícia

Papel da eotaxina-1/ CCL11 na indução de senescência celular em fibroblastos pulmonares e a relação entre inflamação sistêmica e ansiedade no contexto da asma / Patrícia Lavandoski. -- 2024.

112 f.

Orientadora: Fatima Theresinha Costa Rodrigues Guma.

Coorientadora: Florencia María Barbé-Tuana.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. CCL11. 2. senescência. 3. fibroblastos. 4. asma. 5. inflamação. I. Costa Rodrigues Guma, Fatima Theresinha, orient. II. Barbé-Tuana, Florencia María, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que estiveram comigo ao longo desses anos, ampliando meus horizontes ou oferecendo um ombro amigo, meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, aos meus pais, Nadir e Oneida, que sempre foram meus maiores incentivadores e que incutiram em mim desde minhas primeiras memórias o valor da busca constante pelo conhecimento. Ao meu pai, que ao me incluir em atividades como o cultivo da terra e a pesca, me ensinou fisiologia vegetal e anatomia comparada – aprendidas por ele na forma mais pura: pela curiosidade, tentativa e erro. À minha mãe, que elaborou, unicamente por desejo de saber, um caderno de recortes repleto de curiosidades sobre o funcionamento do mundo natural, dos astros, da medicina, caderno este que se tornou minha companhia em incontáveis dias chuvosos. Se hoje estou aqui, é por vocês e para vocês.

Existe um ditado que afirma que a maior saudade é aquela das coisas que não vivemos. Com pesar, posso dizer que tempo tem provado para mim a verdade irremediável dessa afirmação. Obrigada ao meu pai, Nadir Lavandoski, que não pode vivenciar essa conquista, que também é dele. Que o mundo saiba que essas páginas são o seu legado, e que seu nome seja eternizado pela minha e muitas outras trajetórias que também são suas, marcadas pela tua passagem nesse ínfimo instante que chamamos vida. Obrigada mãe, que é meu porto seguro e me acalma com um colo quando o mundo parece grande demais. Ela, a quem tanto admiro, que é minha bússola moral e que tem me mostrado que sempre há tempo para mudança. Obrigada Gabriel, meu irmão mais novo, que me ensina tanto sobre afeto, que tem a coragem de falar sobre amor, que entendeu antes de mim que mais importantes que nossas conquistas são as pessoas com as quais as compartilhamos.

Como não poderia faltar, àqueles que provaram a lucidez do ditado “Quem tem um amigo tem tudo” e que foram meu “ponto pra escorar quando foi absurdo”. Lucas, Juliette, Rafa e

Vini. Vivemos durante o período dessa tese tempos difíceis, cercados por medo e insegurança, nos quais vocês ressignificaram memórias, criando lembranças felizes e plenas. Em meio à escuridão, vocês foram luz. Obrigada pelas sextas animadas, de cachorro-quente, bis e um filme (geralmente de gosto duvidoso). Sem elas eu certamente não teria encontrado forças para seguir em pé enquanto o mundo girava rápido demais. Obrigada também Ari e Vini, pelas memórias incríveis e pelo feito singular de sempre estarem lá pelos amigos, o carinho infindável de vocês é digno de prêmio e sou muito grata por ter conhecido vocês.

Ao meu amigo e companheiro de vida Vinicius Pierdoná, que virou meu mundo de cabeça para cima. Aquele cuja maluquice encontrou a minha e que me fez acreditar que se estudássemos um pouquinho toda noite ao chegarmos em casa (exaustos) faríamos medicina. Que tirou o primeiro trabalho dessa tese do chão comigo, me acompanhando por dias a fio em citometrias que deveriam terminar as 19h, mas nos mantinham no laboratório madrugada adentro. Obrigada por ressignificar minha vida, acreditando mais na minha capacidade do que eu mesma, quando tudo parecia estar dando errado. Obrigada por todas as possibilidades e por todos os planos. E obrigada por preencher meu cotidiano com felicidade. Sou grata também por me dar de presente uma família ampliada. Agradeço muito à Eliana Pierdoná, que cuidou também de mim ao longo desses últimos anos e, principalmente, que nos apoiou incansavelmente durante esse período final e árduo de entrega da tese. E muito obrigada também a Juliana Pierdoná, que mesmo a distância tem oferecido apoio incondicional. E obrigada pelo café trazido de Minas, o qual posso afirmar sem dúvidas que foi o combustível dessa tese.

Agradeço à minha orientadora Professora Dr^a Florencia M. Barbé-Tuana, que me ensinou que tão ou mais importante que as respostas, são as perguntas. Ela, cuja conduta ética, competência e empolgação inesgotável pela ciência admiro enormemente. E parafraseando minha dissertação, que por sua vez parafraseou meu TCC: obrigada por ter lidado com minhas

inseguranças com uma calma estoica e bom humor (ao longo desses 10 anos de parceria, devo acrescentar).

Agradeço também a professora Dra. Fátima Guma, também minha orientadora e a responsável por abrir as portas e desencadear meu fascínio pela pesquisa. Percorremos uma longa e rica trajetória desde aquele fatídico dia em meados de 2013 em que uma aluna assustada de graduação perguntou para a professora de bioquímica se poderia fazer um estágio no laboratório 21. Sou uma grande admiradora da sua conduta profissional e humana, e me deslumbra a empolgação e fascínio que ainda demonstras pela ciência a cada seminário, seja no laboratório ou em sala de aula, inspirando durante anos jovens estudantes a amar a ciência. Agradeço ainda ao laboratório 21 por ser responsável por algumas das melhores memórias da minha trajetória acadêmica e por me apresentar pessoas tão admiráveis. Lá conheci o aspecto mais encantador da universidade: a empolgação compartilhada pelo conhecimento. Nossas discussões sobre a vida o universo e tudo o mais reverberam em mim até hoje. Obrigada por tanto.

Obrigada aos meus colegas incríveis do Grupo de Inflamação e Senescência celular, que sacrificaram horas de lazer para fazer esse trabalho acontecer. Eu não saberia hoje uma ínfima parcela do que sei hoje se não fosse por vocês e pela nossa inquietação compartilhada de quem sempre quer saber um pouco mais sobre o mundo. Aos alunos de iniciação científica passados e presentes - Laura, Marcella, Luma e Bruno –, alguns dos quais precisaram se aventurar no trabalho com animais pela primeira vez, obrigada pela grande ajuda. Aos meus colegas, Lucas, Vinicius, Mariana Parisi, Rafael e Carine, por todo auxílio ao longo desses anos e pelas ricas discussões. Gostaria de estender meus agradecimentos a Lucas Grun e Mariana Parisi – que me guiaram meus primeiros passos na ciência – pela paciência e pelos ensinamentos. E um agradecimento especial para Rodrigo Dornelles, que garantiu que minhas ideias virassem prática. Se minha essência não fosse baseada em ceticismo científico, diria que ele tem o

superpoder de fazer a ciência acontecer, surgindo magicamente em uma nuvem de vapor de autoclave com todo o equipamento necessário para fazer um experimento virar realidade. Agradeço imensamente a todos vocês pela ajuda e pelas risadas, que foram igualmente importantes durante esses anos tão desafiadores.

Ainda, aos colaboradores que me ensinaram a trabalhar com um modelo completamente desconhecido para mim, que a até então só tinha praticado ciência na dimensão celular. Obrigada por sanarem com paciência minhas dúvidas mais bobas, porém genuínas: Dra. Géssica Antunes, Dra. Carolina Luft, Dr. Luis Eduardo Wearick. Também manifesto aqui minha gratidão à Raquel Mattos Oliveira, que me recebeu de braços abertos e me ensinou mais do que eu esperava aprender sobre preparação histológica. E obrigada à prof^a Dra. Jossimara Polettini, por se desdobrar para garantir que eu conseguisse toda a estrutura necessária dentro da UFFS para conseguir concluir os experimentos dessa tese.

Agradeço imensamente ainda a Prof. Dr^a Dra. Rachel Krolow Santos Silva Bast pela relatoria e pela avaliação do presente trabalho e pelas contribuições fundamentais ainda durante o exame de qualificação dessa tese. Ainda, agradeço aos demais membros da banca avaliadora, composta pelo Prof. Dr. Frederico Orlando Friedrich, Dr. Leo Anderson Meira Martins, Prof. Dr. Marcus Herbert Jones e Prof. Dr. Fábio Klamt. Obrigado pelas considerações e por aceitarem o convite para compor a banca avaliadora.

Agradecimentos especiais à UFRGS, pela estrutura e pela possibilidade de acesso à um programa de pós-graduação de excelência. Obrigada ao PPG Bioquímica que foi minha segunda casa ao longo de quase 10 anos de trajetória acadêmica, em especial aos funcionários do Departamento de Bioquímica por todo auxílio ao longo desse período. Agradeço ainda a PUCRS pelas colaborações e a Pro-Pesq e órgãos de pesquisa CAPES, CNPq, pelos recursos

que permitiram a execução desse trabalho e a minha formação. É inegável e digno de admiração a contribuição desses órgãos para o enriquecimento científico e autonomia do país.

“It would be very healthy for the human species if there was less discouragement and more scientists.” – Carl Sagan

“There is a theory which states that if ever anyone discovers exactly what the Universe is for and why it is here, it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and inexplicable. There is another theory which states that this has already happened.” - The Hitchhiker's Guide to the Galaxy, Douglas Adams

ÍNDICE

PARTE I	1
I.1. RESUMO.....	2
I.2. ABSTRACT	3
I.3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
I.4. INTRODUÇÃO	6
I.4.1. Epidemiologia da asma	6
I.4.2. Manifestações clínicas e fisiopatológicas da asma.....	7
I.4.3. Asma e sistema imune.....	10
I.4.3.a. Endotipos de asma	11
I.4.3.b. Papel da eotaxina-1/ CCL11 na asma.....	14
I.4.4. Envelhecimento	15
I.4.4.a. Senescência celular	16
I.4.4.b. Inflamação crônica.....	18
I.4.5. Papel da asma no envelhecimento precoce	20
I.5. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	23
I.6. OBJETIVOS	24
I.6.1. Objetivo geral.....	24
I.6.2. Objetivos específicos.....	24
PARTE II	25
II.1. Capítulo 1: “Eotaxin-1/CCL11 promotes cellular senescence in human-derived fibroblasts through pro-oxidant and pro-inflammatory pathways.”.....	26
II.2. Capítulo 2: “Beyond Respiratory Impacts: Exploring Social Alterations in a House Dust Mite-Induced Chronic Asthma Model”.....	41

II.2.1. INTRODUCTION	42
II.2.2. MATERIALS AND METHODS.....	44
II.2.2.1. Animals.....	44
II.2.2.2. Experimental design	44
II.2.2.3. Biological sampling.....	45
II.2.2.4. Bronchoalveolar lavage (BAL) cellularity	46
II.2.2.5. Histologic preparation	46
II.2.2.5. Cytometric bead array (CBA)	47
II.2.2.6. Open Field task.....	47
II.2.2.7. Social interaction (SI) test	48
II.2.2.7. Statistics.....	49
II.2.3. RESULTS	49
II.2.3.1. HDM-induced leukocyte recruitment and airway inflammation....	49
II.2.3.2. Decreased body weight in HDM chronic asthma model.....	50
II.2.3.3. Increased cytokine secretion in BAL and plasma from the HDM chronic asthma model	50
II.2.3.4. HDM treatment did not induce significant alterations in locomotor activity on the open field test	51
II.2.3.5. HDM-induced asthmatic mice exhibited anxious behavior when faced with a novel social environment.....	51
II.2.4. DISCUSSION	52
PARTE III.....	71
III.1. DISCUSSÃO	72
III.2. CONCLUSÃO	85
III.3. PERSPECTIVAS	86

REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99
ANEXO I – Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS.....	99
.....	100

PARTE I

I.1. RESUMO

A asma é uma doença crônica não transmissível, caracterizada pela hiperresponsividade brônquica e pela inflamação das vias aéreas em diferentes graus. Apesar de comumente associada a sintomas respiratórios, estudos recentes sugerem a presença de alterações compatíveis com o envelhecimento cronológico, bem como uma maior prevalência de doenças neuropsiquiátricas, em indivíduos asmáticos. Nesse contexto, o presente trabalho se propõe a investigar o papel da asma como um possível contribuinte para o processo de envelhecimento a nível celular e sistêmico, explorando os mecanismos subjacentes e destacando a influência da eotaxina-1/CCL11 nesse processo. Para isso, investigamos a capacidade de CCL11 de induzir senescência celular e os potenciais mecanismos envolvidos nesse desfecho na linhagem de fibroblastos pulmonares humanos MRC5. Nossos resultados demonstraram que a sinalização via eotaxina-1/CCL11 desencadeou um aumento proeminente na produção de espécies reativas de oxigênio, acompanhado por uma elevada ativação de vias de resposta de dano ao DNA, evidenciada pela fosforilação de TP53 e H2AX. Essas alterações foram acompanhadas pela indução de senescência celular, evidenciada pelo aumento da atividade da enzima β -galactosidase associada à senescência, redução da capacidade proliferativa mediada por Ki-67 e aumento da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8, mediadores importantes do fenótipo secretor associado à senescência. Além disso, análises adicionais *in silico* revelaram uma expressão elevada de CCL11, assim como de marcadores de envelhecimento celular, como CDKN2A (p16INK4a) e SERPINE1, em células epiteliais pulmonares de pacientes com asma atópica. Por fim, buscamos investigar no contexto da asma a presença de alterações sistêmicas classicamente atribuídas ao envelhecimento. Para isso, camundongos C57BL/6J machos foram submetidos a um protocolo de indução de asma por meio da inalação repetida do extrato comercial de poeira de ácaro doméstico da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus*. Nossos resultados demonstraram um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias não apenas no tecido pulmonar, mas também a nível sistêmico, evidenciado pelo aumento das concentrações plasmáticas de IL-4, INF γ e IL-17A. Ainda, observou-se uma redução no peso global e a exacerbação de comportamentos associados a ansiedade durante o teste de interação social em camundongos asmáticos, quando comparados ao grupo controle. Esses dados sugerem uma interconexão entre asma, inflamação sistêmica, alterações metabólicas e o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas. Em suma, os dados apresentados ao longo dessa tese representam um avanço na ampliação da conceituação clássica da fisiopatologia da asma, elucidando seu papel na promoção precoce de diferentes alterações associadas ao envelhecimento, tanto a nível celular quanto sistêmico.

I.2. ABSTRACT

Asthma is a chronic non-communicable disease characterized by bronchial hyperresponsiveness and varying degrees of airway inflammation. Despite commonly being associated with respiratory symptoms, recent studies suggest the presence of alterations consistent with chronological aging, as well as a higher prevalence of neuropsychiatric disorders, in asthmatic individuals. In this context, the present study aims to investigate the role of asthma as a potential contributor to the aging process at both cellular and systemic levels, exploring underlying mechanisms and highlighting the influence of eotaxin-1/CCL11 in this process. To this end, we investigated the capacity of CCL11 to induce cellular senescence as well as the potential mechanisms involved in this outcome in a human pulmonary fibroblast cell line. Our results showed that eotaxin-1/CCL11 was able to promote a prominent increase in reactive oxygen species production, accompanied by a high activation of DNA damage response pathways, evidenced by p-TP53 and γ H2AX phosphorylation. These alterations were accompanied by cellular senescence induction by CCL11 in these fibroblasts, evidenced by increased senescence-associated β -galactosidase activity, reduced proliferative capacity mediated by Ki-67, and increased secretion of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8, important mediators of the senescence-associated secretory phenotype. Furthermore, additional *in silico* analyses revealed an elevated expression of CCL11, as well as cellular aging markers such as CDKN2A (p16INK4a) and SERPINE1, in pulmonary epithelial cells from atopic asthma patients. Lastly, we sought to investigate the presence of systemic alterations classically attributed to aging in the context of asthma. For this purpose, male C57BL/6J mice were subjected to an asthma induction protocol through repeated inhalation of a commercial house dust mite extract from *Dermatophagoides pteronyssinus*. Our results showed an increased secretion of pro-inflammatory cytokines not only in lung tissue but also at systemic levels, evidenced by elevated plasma concentrations of IL-4, INF γ , and IL-17A. Additionally, a reduction in overall weight and exacerbation of anxiety-related behaviors during the social interaction test were observed in asthmatic mice compared to the control group. These data suggest an interconnection between asthma, systemic inflammation, metabolic alterations, and the development of neuropsychiatric diseases. In summary, the data presented in this thesis represent a significant effort in expanding the classical conceptualization of asthma pathophysiology, elucidating its role in the premature promotion of different age-related alterations, at both cellular and systemic levels.

I.3. LISTA DE ABREVIATURAS

ATM – ataxia-telangiectasia mutada.

CCL11 – Quimiocina 11 de motivo C-C.

DAMP – Padrões Moleculares Associados a Dano.

DDR – Resposta de dano ao DNA.

DSB – Quebra de fita dupla.

FEV₁ - Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo.

GINA - Iniciativa Global para a Asma.

HDM – Ácaro de poeira doméstica.

HRB - Hiperresponsividade brônquica.

IL- Interleucina.

INF γ – Interferon γ .

LBA - Lavado broncoalveolar.

MEC – Matriz extracelular.

NF- κ B – Fator nuclear kappa B.

OVA – Ovalbumina.

p16^{INK4a} – Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 2A.

p21^{CIP1} – Proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 1A.

PBMC – Células mononucleares de sangue periférico.

PCR – Proteína C-reativa.

ROS – Espécies reativas de oxigênio.

SASP – Fenótipo secretor associado a senescência.

SA- β -Gal - enzima β -galactosidase associada à senescência.

SNC – Sistema nervoso central.

SUS – Sistema único de saúde.

T2 – Tipo 2.

TAF – Focos de dano na região telomérica.

TGF- β – Fator de crescimento transformador β .

Th – T auxiliar.

TNF- α – Fator de necrose tumoral α .

TP53 – Proteína tumoral 53.

TSLP – Linfopoiética estromal tímica.

γ H2AX – Histona variante da família de proteínas H2A fosforilada.

I.4. INTRODUÇÃO

I.4.1. Epidemiologia da asma

A asma é uma doença crônica não comunicável caracterizada por hiperresponsividade brônquica (HRB) e variáveis graus de inflamação e obstrução das vias aéreas (Holgate et al., 2015). Essa condição exerce um impacto social expressivo, afetando aproximadamente 300 milhões de jovens e adultos mundialmente, sendo considerada a doença crônica mais prevalente entre crianças na atualidade (Abbafati et al., 2020; Porsbjerg et al., 2023).

No Brasil, há uma escassez de dados epidemiológicos descrevendo um número preciso de indivíduos diagnosticados clinicamente com asma. Porém, estima-se que aproximadamente 20 milhões de pessoas sejam acometidas atualmente por essa condição, com graus variados de morbidade e mortalidade entre as diferentes unidades federativas do país (Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2012). Tratando-se de impactos econômicos e de saúde pública no Brasil, os últimos dados registrados apontam 2.047 óbitos/ano por complicações relacionadas a asma no Brasil, com mais de 120 mil hospitalizações e um custo de aproximadamente 550 milhões de reais para o sistema único de saúde (SUS) entre 2008-2013 (de Araujo Cardoso et al., 2017; Pitrez et al., 2021).

A maior parte das hospitalizações relacionadas à asma decorrem do manejo inadequado e da falta de adesão ao tratamento pelos pacientes. Nesse contexto, uma análise realizada em uma amostra representativa de 400 brasileiros diagnosticados com asma e estratificados de acordo com os critérios definidos pela Iniciativa Global para a Asma (*Global Initiative for Asthma – GINA*) revelou que 9,3%, 56,5% e 34,3% deles apresentavam, respectivamente, asma controlada, parcialmente controlada ou não controlada. Outros estudos também reportam dados semelhantes, indicando que a asma sem controle adequado é uma realidade para 40 a 50% dos pacientes diagnosticados (Cançado et al., 2019; Roncada et al., 2016). Estes resultados estão em conformidade com a literatura global, destacando de maneira contundente a complexidade

e desafios enfrentados no manejo eficaz da asma no cenário brasileiro (Marchioro et al., 2014; Pitrez et al., 2021).

I.4.2. Manifestações clínicas e fisiopatológicas da asma

A asma caracteriza-se como uma condição patológica heterogênea, clinicamente diversa, caracterizada pela limitação variável do fluxo respiratório associada a inflamação crônica das vias aéreas. A sintomatologia da asma abrange uma ampla gama de apresentações clínicas e fenômenos respiratórios, como falta de ar, desconforto torácico, tosse e presença de sibilos expiratórios mediante ausculta, que variam em tempo e intensidade, refletindo a complexidade intrínseca dessa doença respiratória (Global Initiative for Asthma, 2023). O diagnóstico da asma é dificultado, ainda, pela natureza pouco específica dos sintomas associados a ela, demandando frequentemente a consideração de fatores adicionais, como a coexistência de eczema, rinite ou alergia alimentar, bem como a identificação de antecedentes familiares (Papi et al., 2018).

Ainda, é importante notar que as alterações fisiopatológicas características da asma, como o elevado infiltrado inflamatório e a marcada remodelação tecidual, impactam tanto o trato respiratório superior quanto o inferior, resultando em um impacto significativo sobre a qualidade de vida desses pacientes. Esses fenótipos são observados mesmo em pacientes diagnosticados com a forma leve da doença, ressaltando a ubiquidade destas alterações patológicas subjacentes ao quadro clínico da asma (Fahy, 2009; Papi et al., 2018).

O infiltrado inflamatório expressa-se preponderante como um aumento proeminente na quantidade de eosinófilos em amostras de escarro de pacientes com asma, tendo sido um dos primeiros aspectos fisiopatológicos historicamente identificados da doença (Pizzichini, 2002). Estudos subsequentes demonstraram ainda que uma contagem elevada de eosinófilos em amostras de escarro, sangue ou lavado broncoalveolar (LBA) correlaciona-se diretamente com uma maior gravidade da doença (Bousquet et al., 1990; Fahy, 2009; Louis et al., 2000).

Em alguns pacientes, no entanto, a inflamação das vias aéreas se manifesta com um aumento da quantidade de neutrófilos. A predominância de neutrófilos no escarro é mais frequentemente observada em formas mais graves da doença ou durante crises agudas e exacerbações. Apesar da heterogeneidade do processo inflamatório na fisiopatologia da asma, tanto o número elevado de neutrófilos quanto de eosinófilos correlaciona-se com um maior comprometimento das vias aéreas, o qual se reflete pela redução do Volume Expiratório Forçado no Primeiro Segundo (FEV₁) (Fahy, 2009).

Ainda, corrobora a importância do componente inflamatório na asma a eficiência do uso de corticosteroides no manejo dos sintomas em uma parcela substancial dos pacientes. O uso de corticosteroides inalatórios em baixas doses está associado ao alívio dos sintomas respiratórios, promovendo redução da broncoconstrição induzida por exercício, redução das hospitalizações e redução do declínio da função pulmonar em pacientes com exacerbações (Papi et al., 2018).

No entanto, é fundamental notar que a presença de diferentes perfis inflamatórios parece ser um fator determinante da heterogeneidade que define a responsividade ou refratariedade à corticoterapia nesses pacientes. Nesse contexto, a resposta à corticoterapia é notada predominantemente em pacientes com asma eosinofílica, ou seja, com aumento relativo de eosinófilos em amostras de escarro. Em contraposição, aqueles com um perfil inflamatório distinto, marcado pela ausência de eosinofilia (asma não-eosinofílica), mostram-se relativamente resistentes à corticoterapia (Fahy, 2009). A diversidade na composição inflamatória que permeia as vias aéreas parece ser atribuível a mecanismos imunológicos subjacentes, cuja importância para a fisiopatologia da asma será mais amplamente explorada na seção “Asma e sistema imune” (p. 10).

Além do infiltrado inflamatório, uma parcela significativa dos pacientes manifesta alterações estruturais relacionadas ao remodelamento da mucosa subendotelial do trato

respiratório. Essas modificações se evidenciam por meio do acúmulo de danos no epitélio pulmonar, hiperplasia das células caliciformes, aumento da produção de muco, espessamento da membrana basal, angiogênese, aumento da massa muscular lisa, bem como hiperplasia de miofibroblastos e fibroblastos subepiteliais, contribuindo para o estabelecimento de um ambiente pró-fibrogênico (Figura 1) (Fahy, 2015; Holgate et al., 2015; Papi et al., 2018).

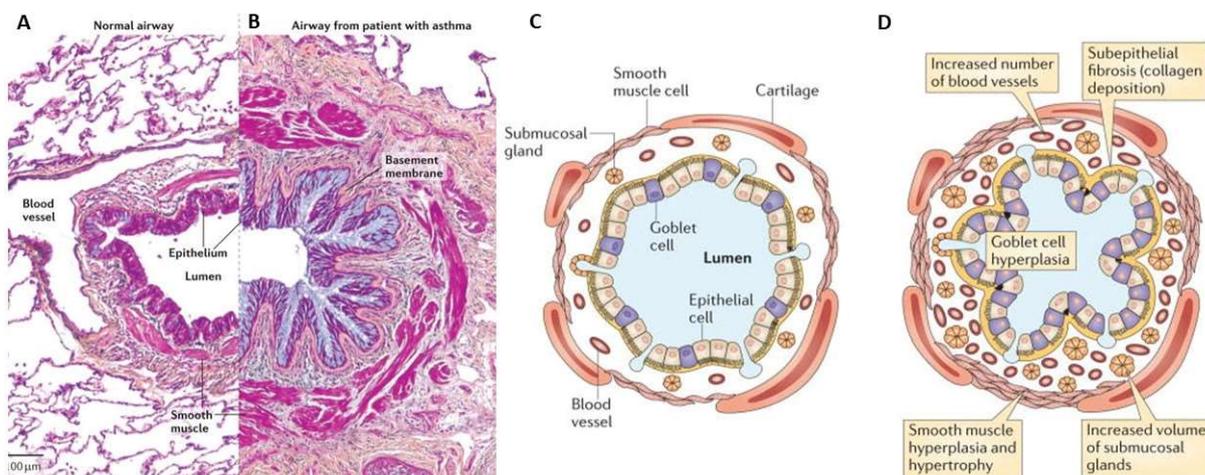


Figura 1 | Manifestações histológicas e fisiopatológicas da asma. A) Corte histológico de vias aéreas de um indivíduo saudável, sem asma, seguido por sua representação esquemática (C). B) Corte histológico de vias aéreas de paciente com asma atópica, seguido por sua representação esquemática (D). Destacam-se na histologia de pacientes com asma o espessamento da membrana basal, o aumento no número de vasos sanguíneos (angiogênese), o aumento da deposição de colágeno resultando em fibrose subepitelial, a hiperplasia e hipertrofia da musculatura lisa e a hiperplasia de células caliciformes (*goblet cells*), responsáveis pela secreção de muco (adaptado de Fahy, 2015).

O remodelamento tecidual é caracterizado por diferentes alterações estruturais no tecido pulmonar que incluem o aumento da deposição de matriz extracelular (MEC) mediado, principalmente, por fibroblastos. De fato, evidências mostram aumento da atividade de fibroblastos em pacientes asmáticos, resultando em produção e secreção elevadas de colágeno, fibronectina e do fator de crescimento transformador β (*Transforming growth factor* - TGF- β), um mediador inflamatório de caráter pró-fibrótico (Hough et al., 2020). Tal é a importância do remodelamento tecidual no contexto da asma, que alguns pesquisadores argumentam que a

avaliação de marcadores associados a esse fenótipo poderia ser mais assertiva enquanto critério diagnóstico do que a análise da celularidade em secreções pulmonares. Esta abordagem ganha destaque pela sua capacidade de identificar manifestações fisiopatológicas mesmo em pacientes afetados por formas mais leves da doença (Khalifaoui et al., 2022).

I.4.3. Asma e sistema imune

Conforme apresentado anteriormente, a inflamação é uma característica proeminente da asma e parece ser responsável pela heterogeneidade de sintomas e pela resposta variável à corticoterapia. Amostras de escarro de pacientes com asma apresentam perfis variados, com predomínio de eosinófilos ou neutrófilos, uma combinação de ambos, ou ainda a manutenção da celularidade a níveis fisiológicos (Papi et al., 2018). Nesse sentido, esforços significativos têm sido empregados para determinação e caracterização de diferentes endotipos de asma, cada qual apresentando padrões fisiopatológicos moleculares e celulares distintos (Kuruvilla et al., 2019).

A crescente relevância na definição desses endotipos reside, sobretudo, nas implicações significativas para o manejo terapêutico e na determinação de prognósticos personalizados dentro do espectro da condição asmática (Fahy, 2015). Este aspecto ganha maior destaque na asma grave, que representa cerca de 5-10% dos diagnósticos. Pacientes com esse perfil apresentam sintomas refratários à corticoterapia, mesmo em doses elevadas, resultando em uma redução significativa na função respiratória e na qualidade de vida (Kuruvilla et al., 2019).

Atualmente, a asma tem sido classificada em dois endotipos: asma tipo 2 (T2)-*high* e T2-*low*. Esses endotipos descrevem respostas imunes distintas, mediadas por diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ ou T auxiliares (*T helpers* – Th), resultando em perfis inflamatórios singulares que frequentemente influenciam a sensibilidade ao tratamento com corticosteroides inalatórios. Embora os mecanismos subjacentes ao endotipo T2-*high* sejam mais amplamente compreendidos, a caracterização do endotipo T2-*low* ainda é incipiente. No

entanto, esforços crescentes têm sido empreendidos para elucidar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes a esse endotipo, visando compreender tanto o perfil inflamatório quanto as respostas sistêmicas associadas a ele (Kuruvilla et al., 2019; Papi et al., 2018).

I.4.3.a. Endotipos de asma

A asma T2-*high*, classicamente definida como asma alérgica, têm alta prevalência, sendo observada em mais de 80% das crianças e em aproximadamente 50% dos adultos asmáticos (Holgate et al., 2015; Papi et al., 2018). Em geral, manifesta-se primariamente na infância em resposta a estímulos ambientais variados, incluindo infecções respiratórias ou a exposição precoce a material particulado e compostos pró-oxidantes, como a fumaça de cigarro. A exposição a esses agentes promove a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo epitélio pulmonar, desencadeando uma cascata de ativação que culmina na diferenciação de linfócitos Th2. Uma vez diferenciados, os linfócitos Th2 passam a secretar diferentes interleucinas (IL), como IL-4, IL-5 e IL-13, cuja presença é fundamental na caracterização do ambiente pró-inflamatório dessa condição. Ademais, a elevação da concentração dessas citocinas promove o recrutamento de eosinófilos para o parênquima pulmonar, resultando na eosinofilia observada em amostras de escarro de pacientes asmáticos (Figura 2) (Kuruvilla et al., 2019).

Apesar da relevância clínica e abrangência, a caracterização do endotipo T2-*low* ainda é incipiente. Nesse sentido, atualmente, a asma T2-*low* caracteriza-se por um diagnóstico de exclusão, sendo definida não pela presença de marcadores próprios, mas pela ausência de marcadores associados ao endotipo T2-*high* (Kuruvilla et al., 2019). A manifestação desse endotipo tem sido observada com maior frequência em associação a condições ou exposições crônicas, como a obesidade, consumo de cigarro, inalação de poluentes ou com o avanço da idade. Nesse sentido, ela é caracterizada como uma condição de início tardio, não sendo observado comumente na população pediátrica. Além disso, pacientes com asma T2-*low*

tendem a manifestar formas mais graves da doença, sublinhando a importância clínica desse endotipo (Peri et al., 2023).

Embora o perfil fisiopatológico da asma T2-*low* ainda não seja consensual, é usualmente caracterizado pela neutrofilia ou paucigranulocitose – associada à ausência de eosinófilos ou neutrófilos em amostras de escarro – e pela composição linfocitária Th1 e Th17 (Figura 2) (Kuruvilla et al., 2019; Peri et al., 2023). Corroborando, Raundhal e colaboradores observaram uma maior presença de linfócitos T CD4⁺ Interferon γ (INF γ)⁺ (associados a um perfil Th1), bem como CD4⁺IL-17A⁺ (associados a um perfil Th17), em amostras de LBA de pacientes com asma grave em comparação com pacientes com asma leve a moderada (Raundhal et al., 2015).

Os níveis de IL-17 também se encontram aumentados em amostras de escarro de pacientes com asma neutrofilica, bem como em biópsias de pulmão de pacientes com asma grave em relação a indivíduos com asma leve ou moderada, sugerindo o envolvimento do perfil Th17 em fenótipos caracterizados por neutrofilia e maior severidade (Al-Ramli et al., 2009; Wei et al., 2021). Ademais, sabe-se que o papel quimiotático sobre neutrófilos exercido pela IL-17 é mediado pela secreção de IL-8, a qual também se encontra elevada em secreções respiratórias de pacientes com asma. Adicionalmente, observou-se que maiores concentrações de IL-8 associam-se à dependência prolongada de ventilação mecânica em pacientes asmáticos experienciando falha respiratória, sugerindo seu papel no agravamento da condição asmática (Ordoñez et al., 2000; Wei et al., 2021).

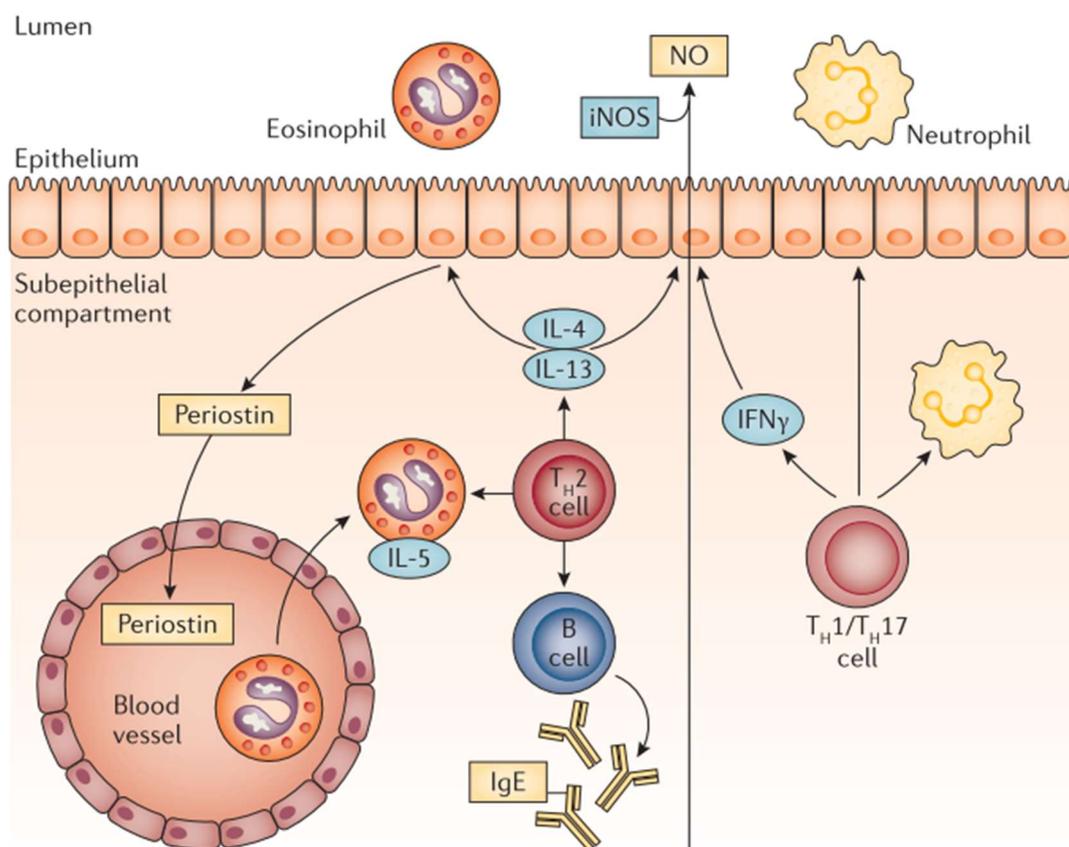


Figura 2 | Características predominantes associadas ao endotipo T2-high (asma eosinofílica) e T2-low (asma neutrofílica). Destacam-se à esquerda a asma T2-high, de caráter eosinofílico e com aumento proeminente da secreção das citocinas IL-4, IL13 e IL-5, acompanhado pela elevação da liberação de IgE por linfócitos B. Ainda, estão listados outros marcadores sugestivos, porém menos estabelecidos desse endotipo. À direita, descreve-se a asma T2-low, cuja fisiopatologia é compreendida em menor grau. Destaca-se o caráter neutrofílico desse endotipo, em associação com a ativação de linfócitos Th1 e/ou Th17 (Holgate et al., 2015).

Entretanto, é importante ressaltar que a eosinofilia e a neutrofilia na asma não são mutuamente exclusivas, sendo frequentemente observadas respostas inflamatórias mistas (Fahy, 2009). Nesse contexto, fica claro que, independentemente da composição fenotípica celular ou humoral evidenciada pelo paciente, o processo inflamatório expressa-se como uma constante no quadro clínico da asma, sendo descrito de forma ubíqua entre os diferentes endotipos. Dessa forma, torna-se evidente a importância de ampliar-se a compreensão sobre os

impactos sistêmicos do processo inflamatório crônico observado na asma (Kuruvilla et al., 2019).

I.4.3.b. Papel da eotaxina-1/ CCL11 na asma

Além das citocinas classicamente associadas ao fenótipo Th2, as células epiteliais pulmonares ainda secretam concentrações elevadas de eotaxina-1 ou quimiocina 11 de motivo C-C (*CC motif chemokine ligand 11* – CCL11) em resposta à estimulação exógena durante o desenvolvimento da asma alérgica. Nesse contexto, concentrações elevadas de CCL11 são observadas tanto em amostras de escarro quanto no plasma de crianças com asma alérgica grave (Barbé-Tuana et al., 2021; Daldegan et al., 2005).

CCL11 é uma molécula quimioatrativa central na mobilização de eosinófilos para o parênquima pulmonar. Apesar de diferentes citocinas Th2 poderem atuar na promoção da eosinofilia, CCL11 parece desempenhar papel central nesse processo (Huaux et al., 2005). Nesse sentido, demonstrou-se que a inibição de CCL11 foi capaz de prevenir de forma substancial o recrutamento de eosinófilos para o local de ativação em camundongos submetidos a estimulação pró-alérgica, evidenciando assim o papel crucial desta quimiocina nesse processo (Mishra et al., 2001). Adicionalmente, a elevação dos níveis de CCL11 em biópsias de mucosa bronquial se correlaciona com o aumento da suscetibilidade a exacerbações, o que sugere a relevância desta quimiocina também no agravamento da condição asmática (Ying et al., 1997).

Concomitantemente, CCL11 tem sido associado ao estabelecimento do processo fibrótico no parênquima pulmonar, característica central para o remodelamento tecidual observado em pacientes asmáticos. Sob essa perspectiva, estudos demonstraram que a depleção de CCL11 em camundongos é capaz de prevenir a progressão da fibrose induzido por bleomicina, destacando assim o papel desta quimiocina na patogênese da fibrose pulmonar (Huaux et al., 2005). Ademais, a centralidade de CCL11 na promoção de alterações da composição da MEC e no

remodelamento tecidual no contexto da asma é corroborada pela percepção de que essa molécula atua centralmente na indução da proliferação de fibroblastos pulmonares e na indução da deposição de colágeno nesse tecido (Puxeddu et al., 2006).

I.4.4. Envelhecimento

O envelhecimento se caracteriza pela deterioração progressiva da integridade fisiológica, culminando no comprometimento funcional do organismo e no aumento da morbidade e mortalidade. Esse declínio abrange diversos domínios do organismo, resultando em redução de massa muscular, comprometimento cognitivo, disfunção cardiovascular, diminuição da capacidade pulmonar, entre outros. Além disso, o processo de envelhecimento aumenta a suscetibilidade ao desenvolvimento de diversas doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson e Alzheimer (Franceschi et al., 2018; Labarthe et al., 2016; López-Otín et al., 2013).

A compreensão contemporânea da fisiopatologia do envelhecimento concentra-se na identificação de 12 marcadores distintos, denominados "*Hallmarks of Aging*", os quais descrevem processos celulares, moleculares e sistêmicos que respondem às alterações funcionais observadas com o avanço da idade. Originalmente, López-Otín e colaboradores (2013) propuseram 9 marcadores para o envelhecimento: instabilidade genômica, encurtamento telomérico, modificações epigenéticas, perda de homeostase proteica, desregulação da resposta metabólica, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão do compartimento tronco e alterações na comunicação intracelular (López-Otín et al., 2013).

Após anos de escrutínio, a literatura não apenas confirmou, mas reafirmou a importância desses marcadores para o processo de envelhecimento. Contudo, em uma atualização recente, os autores propuseram a inclusão de outros três marcadores a essa lista, devido à crescente percepção da sua relevância no contexto do envelhecimento: inflamação crônica, inativação da autofagia e disbiose (Figura 3) (López-Otín et al., 2023). A identificação e categorização

desse marcadores assumem uma grande relevância no panorama do estudo do envelhecimento, propiciando uma análise mais objetiva dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes a ele e contribuindo para o entendimento holístico das complexas alterações biológicas associadas a esse processo.

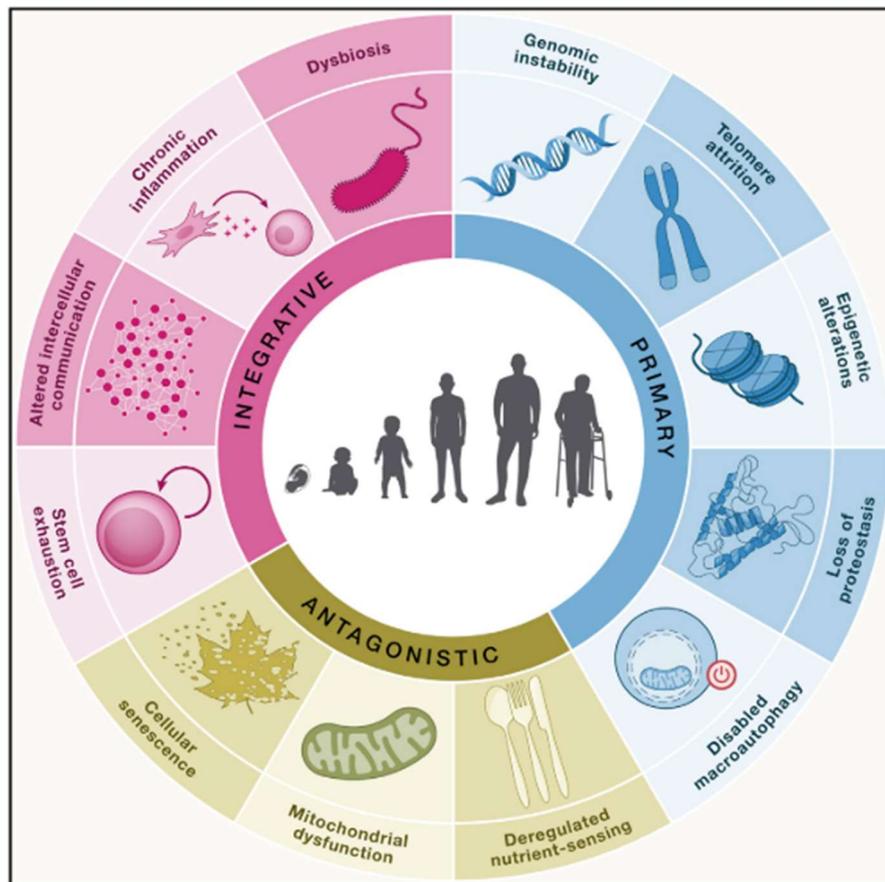


Figura 3 | “Hallmarks of aging”. O esquema ilustra dos 12 marcadores do envelhecimento propostos por López-Otín (2023). Em sentido horário: instabilidade genômica, encurtamento telomérico, modificações epigenéticas, perda da homeostase proteica, inativação da macroautofagia, desregulação da resposta metabólica, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão do compartimento tronco, alterações na comunicação intracelular, inflamação crônica e disbiose.

I.4.4.a. Senescência celular

O processo de envelhecimento está intrinsecamente relacionado ao aumento do número de células senescentes em diversos tecidos, resultando em uma progressiva deterioração funcional e, posteriormente, na perda de funcionalidade do órgão (Baker et al., 2011). A

senescência celular é conceitualmente definida pela parada irreversível do ciclo celular resistente a estímulos mitogênicos (Sharpless & Sherr, 2015). Esse fenótipo pode ser induzido por diferentes eventos estressores, como o encurtamento telomérico associado à exaustão proliferativa, acúmulo de dano ao DNA, alterações epigenéticas ou ainda ativação atípica de oncogenes. Tais processos frequentemente acompanham o envelhecimento cronológico, levando a compreensão da senescência como um fenômeno de envelhecimento a nível celular (Campisi, 2013).

O fenótipo senescente é comumente definido pela presença de marcadores moleculares que refletem alterações morfológicas e funcionais da célula. Dentre esses marcadores, estão inclusas modificações na composição das membranas plasmáticas e nuclear, alteração na composição lisossomal, atividade elevada da enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -Gal), e disfunção mitocondrial (Campisi et al., 2011; Hernandez-Segura et al., 2018). Ademais, a ativação crônica de vias de resposta de dano ao DNA (*DNA damage response* – DDR) frente o acúmulo de insultos genotóxicos é frequentemente descrita como importante efetor desse fenótipo (Hernandez-Segura et al., 2018). Nesse sentido, em resposta à detecção de quebras em regiões de fita dupla (*double-strand breaks* – DSB), a célula promove rapidamente o recrutamento de proteínas cinase específicas, como a ataxia-telangiectasia mutada (ATM), para o local da lesão. A ativação subsequente de ATM leva à fosforilação e formação da histona variante da família de proteínas H2A fosforilada (*phosphorylated H2A histone family member X* – γ H2AX), que atua facilitando a formação de complexos de reparo do DNA (D’Adda Di Fagagna, 2008), culminando no recrutamento e fosforilação da proteína tumoral 53 (*tumor protein 53* – TP53), um regulador central da parada irreversível do ciclo celular associada à senescência (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Nesse sentido a formação de γ H2AX, assim como a ativação persistente de TP53, são amplamente reconhecidos como marcadores de senescência celular (Hernandez-Segura et al., 2018).

Ademais, um dos principais desfechos observados na senescência é a alteração do secretoma dessas células, que assumem um fenótipo secretor complexo e heterogêneo, denominado fenótipo secretor associado a senescência (*senescence-associated secretory phenotype* - SASP) (Sharpless & Sherr, 2015). Nesse sentido, o SASP caracteriza-se pela secreção de citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-8, metaloproteinases e fatores angiogênicos, que atuam no estabelecimento do ambiente pró-inflamatório característico desse fenótipo. No entanto, é importante notar que o SASP não atua apenas como elemento promotor de inflamação, mas também como mediador crucial dos efeitos parácrinos e sistêmicos da senescência, influenciando microambientes teciduais, respostas imunológicas e patologias relacionadas ao envelhecimento. Dessa forma, o SASP atua como pivô na propagação sistêmica dos efeitos da senescência. De fato, o acúmulo de células senescentes observado no envelhecimento cronológico, acompanhado pelo aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias características do SASP, parece ser um fator importante no estabelecimento do *inflammaging*, favorecendo o desencadeamento e a progressão de diversas doenças associadas ao envelhecimento (Olivieri et al., 2018).

I.4.4.b. Inflamação crônica

A inflamação crônica se destaca como uma característica proeminente do envelhecimento, dando origem a um termo e campo de estudo denominados "Inflammaging". O termo *inflammaging* refere-se a um estado pró-inflamatório sistêmico, crônico, progressivo e de baixo grau que é observado mesmo na ausência de agentes infecciosos (inflamação estéril), estabelecendo-se gradualmente com o avanço da idade. Esse fenótipo se manifesta por meio do aumento moderado de marcadores inflamatórios como IL-6, IL-8 e proteína C-reativa (PCR), os quais estão associados a um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças crônicas, além de uma maior morbidade e mortalidade (Campisi, 2013; Franceschi et al., 2000; Franceschi & Campisi, 2014).

Embora a fonte exata das citocinas que constituem o *inflammaging* ainda não tenha sido completamente elucidada, a resposta parece residir na ocorrência de um processo de extravasamento periférico de moléculas pró-inflamatórias produzidas em tecidos perpassando uma resposta inflamatória local e crônica. Ilustrando esse mecanismo, pode-se tomar como exemplo a obesidade, em que a expansão exacerbada do tecido adiposo resulta em hipóxia. A morte celular resultante da hipóxia local leva ao extravasamento de citocinas pró-inflamatórias e padrões moleculares associados a dano (*damage-associated molecular pattern* – DAMPs), com conseqüente recrutamento da imunidade periférica para a resolução do dano tecidual. Quando o dano se torna exacerbado, as células do sistema imune não são capazes de corrigi-lo, e passam a se acumular no tecido, amplificando ainda mais a secreção local de citocinas pró-inflamatórias. Com a cronicidade desse processo, essas moléculas passam a migrar em grandes quantidades para a circulação periférica, estabelecendo um estado de *inflammaging* (Franceschi & Campisi, 2014b; Frasca et al., 2017).

Esse cenário ainda evidencia o fato de que, embora o conceito de *inflammaging* tenha sido inicialmente elaborado para descrever um perfil inflamatório crônico idade-dependente, sua expressão parece se dar precocemente em associação com condições patológicas. Nesse contexto, é plausível especular que a asma, uma condição caracterizada por sua natureza pró-inflamatória crônica, possa ser estudada como uma condição de envelhecimento precoce, com uma manifestação prematura do *inflammaging*. Corroborando, é possível observar que citocinas secretadas localmente no pulmão de pacientes com asma, como IL-4, IL-5, IL-8, fator de necrose tumoral α (*tumor necrose factor α* – TNF- α) e CCL11 (Konno et al., 1996; Vizmanos-Lamotte et al., 2013), são também encontradas a nível periférico em amostras de plasma sanguíneo, sugerindo a sistematização do processo inflamatório e o estabelecimento de um fenótipo tal qual ou similar ao *inflammaging* (Barbé-Tuana et al., 2021; Daldegan et al., 2005; Huang et al., 2016; Lee et al., 2001).

I.4.5. Papel da asma no envelhecimento precoce

Atualmente, a compreensão do envelhecimento tem experimentado uma evolução conceitual à medida que o acúmulo dos marcadores tradicionalmente vinculados ao avanço cronológico da idade, tem sido observado precocemente em algumas condições patológicas. Nesse contexto, o envelhecimento tem sido abordado sob dois paradigmas distintos: o cronológico e o biológico. Enquanto o envelhecimento cronológico considera que todos os indivíduos envelhecem a um ritmo semelhante ao longo do tempo, o envelhecimento biológico leva em conta que alguns podem experimentar um declínio funcional precoce devido a variações nos processos biológicos associados ao envelhecimento (Labarthe et al., 2016).

Sob esse prisma, é possível traçar alguns paralelos importantes entre o declínio funcional observado com o avanço da idade e a asma, sugerindo que essa possa ser uma condição associada ao envelhecimento precoce. Durante o envelhecimento cronológico, o trato respiratório experencia diversas alterações funcionais e estruturais, tais como declínio da função respiratória, redução do volume expiratório forçado, remodelamento tecidual e maior suscetibilidade a infecções virais (Brandenberger & Mühlfeld, 2017). Interessantemente, essas manifestações encontram intersecção importante com aquelas expressas por pacientes asmáticos, principalmente entre aqueles com um pior manejo dos sintomas (Papi et al., 2018).

Apesar dessa proximidade funcional e fisiológica, pouco se conhece sobre os aspectos moleculares relacionados ao envelhecimento na asma. Buscando ampliar compreensão da asma sob a perspectiva do envelhecimento, Aghali e colaboradores demonstraram um aumento significativo na presença de células senescentes na musculatura lisa das vias aéreas de pacientes idosos com asma em comparação com indivíduos não asmáticos de mesma faixa etária, destacando a expressão elevada de TP53 fosforilada e da proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 1A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A* – p21^{CIP1}), acúmulo de focos

de dano na região telomérica (*Telomere-associated foci* – TAF) e aumento na expressão de diferentes elementos do SASP, como IL-6 e IL-8 (Aghali et al., 2022).

Ademais, Barbé-Tuana e colaboradores observaram redução no comprimento telomérico em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de crianças com asma grave em relação a controles atópicos, um indicativo importante de envelhecimento prematuro associado a essa condição. Observou-se, ainda, uma correlação negativa entre a concentração de CCL11 plasmático e o comprimento dos telômeros, ou seja, maiores concentrações periféricas de CCL11 – molécula importante no estabelecimento da eosinofilia na asma T2-*high* – estavam associadas com telômeros mais curtos nessas crianças (Barbé-Tuana et al., 2021). Logo, é possível inferir que alterações moleculares observadas no envelhecimento cronológico possam também manifestar-se em pacientes asmáticos.

Portanto, mediante a compreensão da asma como uma condição pró-inflamatória, crônica e sistêmica, é plausível conjecturar que ela possa desempenhar um papel relevante na indução de alterações compatíveis com o envelhecimento precoce tanto a nível celular quanto sistêmico.

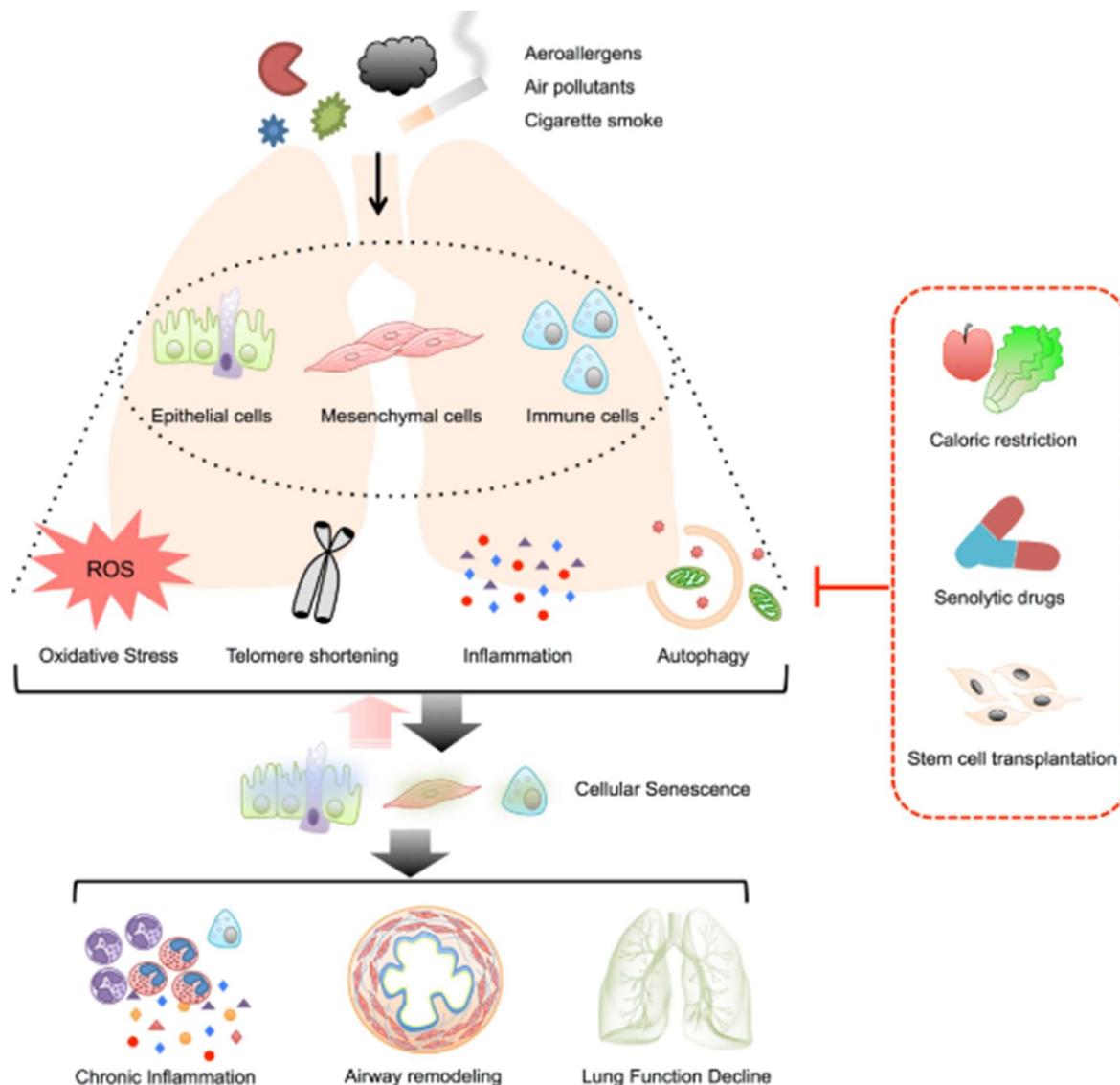


Figura 4 | Possíveis mecanismos associados à senescência celular na asma. Estresse oxidativo, encurtamento telomérico, inflamação crônica e disfunção da autofagia em resposta a diferentes estímulos exógenos, poderiam culminar na senescência das células epiteliais, mesenquimais e imunes no parênquima pulmonar de pacientes asmáticos. Uma vez senescentes, essas células poderiam promover ainda a indução desse fenótipo em células circundantes, pelo meio do SASP, estabelecendo um mecanismo de retroalimentação positiva. Especula-se que o acúmulo de células senescentes no parênquima pulmonar contribuiria para a fisiopatologia da asma, amplificando a inflamação crônica das vias aéreas, bem como contribuindo para remodelação tecidual e o declínio da função respiratória. Os autores ainda sugerem que o emprego de estratégias associadas a redução do acúmulo de células senescentes, como restrição calórica, administração de drogas senolíticas ou transplante de células-tronco poderiam representar terapias promissoras no manejo da asma (Wang, Z., 2020).

I.5. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

É amplamente reconhecido que os níveis plasmáticos de eotaxina-1/ CCL11 aumentam significativamente tanto no contexto da asma quanto do envelhecimento cronológico, sugerindo que essa quimiocina possa desempenhar um papel importante na intersecção entre esses processos. Porém, relações de causalidade entre a exposição a CCL11 e a indução de senescência celular ainda não foram descritas. Portanto, nossa hipótese é de que CCL11 atue como uma molécula indutora de senescência celular ao promover um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) e consequente acúmulo de dano ao DNA, levando ao recrutamento da maquinaria de DDR e resultando na parada permanente do ciclo celular associada a senescência.

Ademais, considerando a asma como uma condição associada à inflamação crônica, nossa hipótese se estende para sugerir que essa condição resulta em um aumento sistêmico dos níveis de citocinas pró-inflamatórias compatível com envelhecimento precoce. Sugerimos, ainda, que essas citocinas possam promover diferentes alterações sistêmicas, especialmente aquelas associadas a mudanças cognitivo-comportamentais e neuropsiquiátricas em modelos murinos de asma.

I.6. OBJETIVOS

I.6.1. Objetivo geral

Ampliar a compreensão atual da fisiopatologia da asma, investigando o impacto dessa condição sobre o estabelecimento de fenótipos associados ao envelhecimento a nível celular, sistêmico e comportamental.

I.6.2. Objetivos específicos

Capítulo 1

Investigar o papel da eotaxina-1/CCL11 na indução de senescência celular, bem como investigar os mecanismos envolvidos no estabelecimento do fenótipo senescente em linhagem de fibroblastos pulmonares humanos.

Capítulo 2

Explorar o papel da asma no estabelecimento de um perfil pró-inflamatório crônico comparável ao envelhecimento cronológico e avaliar o impacto desse fenótipo sobre comportamentos associados a ansiedade em modelo murino de asma crônica induzida por extrato de ácaro de poeira doméstica *Dermatophagoides pteronyssinus*.

PARTE II

II.1. Capítulo 1: “Eotaxin-1/CCL11 promotes cellular senescence in human-derived fibroblasts through pro-oxidant and pro-inflammatory pathways.”

(Artigo publicado no periódico *Frontiers in Immunology*/ Fator de impacto: 7.3/ Qualis-CAPES-CBII: A2.)

Justificativa: A eotaxina-1/CCL11 desempenha um papel central no recrutamento de eosinófilos para o parênquima pulmonar, sendo uma molécula efetora da eosinofilia na asma T2-*high*. Recentemente, no entanto, CCL11 também tem sido implicada no processo de envelhecimento, com níveis aumentados detectados no plasma de indivíduos idosos. Além disso, essa quimiocina parece estar envolvida na indução de fenótipos associados ao envelhecimento celular, como o encurtamento telomérico. Nesse sentido, um estudo anterior do nosso grupo observou uma correlação inversa entre a concentração plasmática de CCL11 e o comprimento telomérico de células mononucleares de sangue periférico de crianças com asma grave. Porém, apesar do seu papel na mediação de processos fisiopatológicos associados ao envelhecimento, o papel do CCL11 na indução da senescência celular, bem como os mecanismos celulares por ele ativados em células do parênquima pulmonar ainda não são conhecidos. Portanto, o objetivo principal deste estudo foi explorar o papel de CCL11 no desenvolvimento da senescência, bem como as vias de sinalização ativadas por esta quimiocina em linhagens de fibroblastos pulmonares humanos.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Emilia Lecuona,
Northwestern University, United States

REVIEWED BY

Juan José Nieto-Fontarigo,
University of Santiago de Compostela,
Spain

Pankaj Kumar Bhavsar,
Imperial College London, United Kingdom

*CORRESPONDENCE

Florencia María Barbé-Tuana
✉ florencia.tuana@pucrs.br

RECEIVED 20 June 2023

ACCEPTED 18 September 2023

PUBLISHED 04 October 2023

CITATION

Lavandoski P, Pierdoná V, Maurmann RM,
Grun LK, Guma FT and Barbé-Tuana FM
(2023) Eotaxin-1/CCL11 promotes
cellular senescence in human-derived
fibroblasts through pro-oxidant and
pro-inflammatory pathways.
Front. Immunol. 14:1243537.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1243537

COPYRIGHT

© 2023 Lavandoski, Pierdoná, Maurmann,
Grun, Guma and Barbé-Tuana. 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.

Eotaxin-1/CCL11 promotes cellular senescence in human-derived fibroblasts through pro-oxidant and pro-inflammatory pathways

Patrícia Lavandoski¹, Vinícius Pierdoná¹,
Rafael Moura Maurmann², Lucas Kich Grun³,
Fatima T. C. R. Guma¹ and Florencia María Barbé-Tuana^{2,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde de Criança da Escola de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Introduction: Eotaxin-1/CCL11 is a pivotal chemokine crucial for eosinophil homing to the lungs of asthmatic patients. Recent studies also suggest that CCL11 is involved in the aging process, as it is upregulated in elderly, and correlated with shorter telomere length in leukocytes from asthmatic children. Despite its potential pro-aging effects, the precise contribution of CCL11 and the underlying mechanisms involved in the promotion of cellular senescence remains unclear. Therefore, the primary goal of this study was to explore the role of CCL11 on senescence development and the signaling pathways activated by this chemokine in lung fibroblasts.

Methods: To investigate the targets potentially modulated by CCL11, we performed an *in silico* analysis using PseudoCell. We validated *in vitro* the activation of these targets in the human lung fibroblast cell line MRC-5 following rhCCL11 exposure. Finally, we performed differential gene expression analysis in human airway epithelial cells of asthmatic patients to assess CCL11 signaling and activation of additional senescent markers.

Results: Our study revealed that eotaxin-1/CCL11 promote reactive oxygen secretion (ROS) production in lung fibroblasts, accompanied by increased activation of the DNA damage response (DDR) and p-TP53 and γ H2AX. These modifications were accompanied by cellular senescence promotion and increased secretion of senescence-associated secretory phenotype inflammatory cytokines IL-6 and IL-8. Furthermore, our data show that airway epithelial lung cells from atopic asthmatic patients overexpress CCL11 along with aging markers such as CDKN2A (p16INK4a) and SERPINE1.

Discussion: These findings provide new insights into the mechanisms underlying the pro-aging effects of CCL11 in the lungs of asthmatic patients. Understanding the role of CCL11 on senescence development may have important implications for the treatment of age-related lung diseases, such as asthma.

KEYWORDS

CCL11, eotaxin-1, senescence, fibroblasts, asthma, premature aging, lung

1 Introduction

Asthma is a chronic noncommunicable inflammatory disease characterized by bronchial hyperresponsiveness, airway obstruction, increased mucus secretion, chronic airway inflammation, and extracellular matrix remodeling (1). Asthma symptoms may include shortness of breath, chest tightness, cough, and expiratory wheezing on auscultation (2). This condition affected around 262 million people worldwide in 2019, causing 455,000 deaths (3), and represents a major burden to patients and health systems around the world.

Asthma is a heterogeneous disease with various endotypes, and the most common one is type-2 inflammation, affecting more than 80% of children and around 50% of asthmatic adults (1, 2). This inflammatory response is orchestrated by lymphocytes in response to common allergens. During the sensitization phase, allergen-specific CD4⁺ T helper 2 (TH2) cells infiltrate and produce type-2 cytokines, primarily interleukin (IL)-4, IL-5, IL-9, and IL-13 (4, 5). While eosinophils constitute the majority of the inflammatory infiltrate in type-2 asthmatic patients, mast cells, neutrophils, TH2 lymphocytes, and monocytes/macrophages are also present (6–8), illustrating the complex inflammatory nature of asthma.

In addition to type-2 cytokines, epithelial cells play a crucial role by secreting eotaxin-1/CCL11, a central chemoattractant for eosinophil homing to the lungs. This chemokine is observed in asthmatic patients' bronchial mucosal biopsy in correlation with increased susceptibility to exacerbation (9) and is also increased in plasma and sputum from atopic children (10, 11).

Furthermore, CCL11 appears to be involved in lung fibrosis, a central feature for tissue remodeling observed in asthmatic patients, as its depletion prevented pulmonary fibrosis in mice (12). Additionally, CCL11 promotes proliferation and increased collagen expression in lung fibroblasts, suggesting its role in extracellular matrix deposition and tissue remodeling in asthma mediated by fibroblasts (13).

Interestingly, CCL11 has been recognized as a regulator of physiological decline in chronological aging. Plasmatic concentrations of CCL11 are increased in older subjects (14, 15) and associated with systemic aging, poor cognitive function, and decreased neurogenesis (15). Moreover, elevated levels of CCL11 are observed in severe asthmatic children and correlated with

reduced telomere length in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), an important marker of cellular aging (11).

A central feature of aging is the increased prevalence of senescent cells in different tissues, leading to decreased function and ultimately to organ failure (16). Cellular senescence is defined as an irreversible cell cycle arrest even in the presence of mitogenic factors and represents the aging process at cellular level (17, 18).

Senescence can be triggered by persistent DNA damage signals, leading to the stabilization of tumor protein P53 (TP53) and induction of cyclin-dependent kinase inhibitors, such as P21 (CDKN1A), and P16 (p16INK4a, CDKN2A). Additionally, senescence is associated with phenotypic modifications, including augmented cell size and nuclear area, increased β -galactosidase activity (19), reactive oxygen species (ROS) overproduction, and the secretion of inflammatory proteins and matrix metalloproteinases, which constitute the senescence-associated secretory phenotype (SASP) (20, 21).

During chronological aging, the respiratory tract undergoes several structural and functional changes, such as decreased lung function, declining maximal aerobic capacity, reduced pulmonary forced expiratory volume, tissue remodeling, compromised regeneration, and enhanced susceptibility to respiratory infections (22). Furthermore, key senescence mediators such as TP53, P21, and the phosphorylated histone H2AX (γ H2AX), an early cell response to DNA double-strand breaks (DSB), are upregulated in aged lungs. These senescence-related alterations play a crucial role in the deterioration of lung function during chronological aging (23).

Aging lungs often experience compromised function due to the establishment of a profibrotic environment with increased extracellular matrix (ECM) deposition, resulting from heightened fibroblast activation. The increased density of lung senescent cells appears to directly contribute to aging-associated ECM changes (23). Considering its central role in orchestrating ECM homeostasis, senescent fibroblasts emerge as crucial drivers of tissue remodeling and potentially contribute to the predisposition to age-related pulmonary diseases, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) (24, 25). Also, senescent fibroblasts secrete SASP components, such as IL-6 and IL-8, contributing to the chronic pro-inflammatory environment described as a central feature of lung aging (24, 26).

Interestingly, many of these aging features, such as decreased lung function and airway tissue remodeling are shared by asthmatic patients (1). Therefore, it is possible that the lung parenchyma in asthma undergoes a process of premature aging due to increased stress caused by inflammation and ROS overproduction, which may result from fibroblast dysfunction (27). In this report, our main goal was to investigate whether CCL11, a prominent pro-aging chemokine, is capable of inducing senescence in human-derived fibroblasts and the role of oxidative stress and inflammation in this process. Our results demonstrate that CCL11 induced ROS and cytokine overproduction, leading to cellular senescence in human-derived lung fibroblasts.

2 Materials and methods

2.1 Cell culture

MRC5 is a diploid fibroblast cell line isolated from lung tissue of a white, male, 14-week-old human embryo (HEF). MRC5 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, CCL-171TM, Rockefeller, MD, USA). Cells were cultured in low-glucose (1 g/L) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GibcoTM, Waltham, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), and 1% (v/v) penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin and 10 mg streptomycin/mL, Sigma-Aldrich®, San Luis, USA) at 37°C in 5% CO₂ humidified atmosphere incubator. When necessary, cells were detached with trypsin (0.05% trypsin-EDTA 1:10 in saline, Gibco), inactivated with 2:1 of DMEM low glucose (Gibco) supplemented with 10% FBS and used for subsequent analyses.

2.2 Treatment with rhCCL11

Recombinant human CCL11 (rhCCL11, PeproTech, Waltham, USA) was reconstituted in phosphate buffered saline supplemented with 0.18g/100 mL of glucose, aliquoted and frozen at -80°C until use. MRC5 cells were seeded at 10⁵/mL and treated with increasing concentrations of rhCCL11 as described for each assay.

2.3 Evaluation of reactive oxygen species production

Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was evaluated using 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich). MRC5 cells were cultured in 96 well plate (10⁴ cells/200uL final solution) and treated for 4 or 24 hours with 100, 250 and 500ng/10⁵cells/mL doses of rhCCL11. Cells were resuspended in a rhCCL11 solution diluted in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma-Aldrich) without phenol red. Immediately, cells were incubated in the dark with 10μM DCFH-DA for ROS quantification. Alternatively, cells were treated with increasing concentrations of rhCCL11 in DMEM low glucose (1 g/L) supplemented with 10% FBS (Gibco) 24 hours before ROS

quantification. The fluorescence generated by DCF was measured using a 96-well microplate reader (VICTORX Multilabel Plate Readers, PerkinElmer) at 485/535nm (excitation/emission). One hundred twenty (120) readings were performed with 1-second intervals between each measure in the course of 4 hours. The results are expressed as relative fluorescence units (RFU).

2.4 Intracellular γH2AX, p-TP53 and Ki-67

MRC5 cells were seeded in a 24 well plate until reach approximately a 10⁵ cells/mL density and then treated with 500ng/10⁵cells/mL of rhCCL11 for 2h or 24h. Cells were trypsinized and washed twice with FACS buffer (saline supplemented with 2% of FBS), fixed with BD CytofixTM Fixation Buffer (BD Biosciences, San Jose, California) for 20 minutes at 4°C and permeabilized with BD PhosflowTM Perm Buffer III (BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C. Cells were washed again with FACS Buffer and incubated with the following antibodies: Alexa Fluor® 647 Mouse anti-H2AX (pS139) 1:200 (#560447 BD Biosciences) and Alexa Fluor® 488 Mouse anti-p53 (pS37) 1:50 (#560282 BD Biosciences) for 30 minutes at 4°C on dark. For the proliferation assay cells were stained with Alexa Fluor® 488 Mouse anti-Ki-67 1:200 (#561165, BD Biosciences). Finally, cells were washed and resuspended in FACS buffer for acquisition (10.000 events).

2.5 Senescence-associated-β-galactosidase activity

MRC5 cells were seeded in a 24 well plate until reach approximately a 10⁵ cells/mL density and then treated with 500ng/10⁵cells/mL of rhCCL11 for 24 hours or 50ng/mL for 5 days in DMEM low glucose (1 g/L) supplemented with 10% FBS. For the 5-day treatment, MRC5 cells were exposed at day 1 to 50 ng/mL of rhCCL11. After 3 days, 50% of the media was replaced with fresh DMEM low glucose 10% FBS media containing rhCCL11 to achieve a final concentration of 50 ng/mL. At day 5, the cells were trypsinized and assessed for C₁₂FDG activity. Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity was evaluated using the fluorogenic substrate C12FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di-β-D-Galactopyranoside, InvitrogenTM). For SA-β-gal activity, cells were trypsinized and treated with 100μM of chloroquine for 1h at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere to induce lysosomal alkalization. Then, C12FDG (33μM) was added, and cells were incubated for an additional 1h before acquisitions by flow cytometry.

2.6 MTT Assay

Cell viability was measured by MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, Sigma Inc.). MRC5 were cultured in 96 well plate (10⁴ cells/well) and incubated with increasing concentrations of rhCCL11 in DMEM low glucose 10%

FBS (Gibco) for 4 hours as described on section 2.3. For formazan crystal formation quantification, cells were incubated with 0.5mg/mL of MTT for 2 h at 37°C, lysed in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and read at absorbance $\lambda = 570$ nm in a 96-well microplate spectrophotometer (Zenyth 340r Microplate Reader) with previous agitation.

2.7 Cytometric bead array

Cytokine secretion was measured in cell culture media 24 hours after treatment with 500ng/10⁵cells/mL of rhCCL11 by Cytometric Bead Array with the Human Inflammatory Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Data was analyzed with FCAP Array v3.0.1 software (Soft Flow Inc., Pecs, Hungary). Standard curves were run in duplicate, and results were expressed as picograms per milliliter (pg/mL). Theoretical lower limits of detection accordingly to the manufacturer are IL-8 (3.6 pg/mL), IL-1 β (7.2 pg/mL), IL-6 (2.5 pg/mL), IL-10 (3.3 pg/mL), TNF- α (3.7 pg/mL) and IL-12p70 (1.9 pg/mL). When analyzing cytokine levels, samples with values below the lower limit of detection (LLOD) were assigned a value of LLOD divided by the square root of two. Samples with values between the LLOD and upper limit of detection (ULOD) were considered detectable for specific cytokines (28).

All acquisitions were made in a BD FACSCantoTM II (BD Biosciences) with a 3-laser, 4-2-2 configuration (Violet 405 nm, Blue 488 nm and Red 633 nm). FACS data from immunophenotyping was analyzed with FlowJoTM v10.8.1 (BD Life Sciences).

2.8 ELISA assay

MRC-5 cells were seeded in 24-well plate at 1x10⁵ cells/well and treated with 500ng/10⁵cells/mL of rhCCL11 for 24 hours. Each well was then washed with saline, reconstituted with new media (DMEM low glucose 10% FBS) and incubated for another 24 hours at 37°C and 5% CO₂ humidified atmosphere. Eotaxin-1/CCL11 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Human Eotaxin (CCL11) Standard ABTS ELISA Development Kit, Peprotech) according to the manufacturer's instructions from 100 μ L of conditioned media stored at -80° C.

2.9 *In silico* simulation of increasing CCL11 frequency of activation

PseudoCell is a software application that was developed to enable *in silico* prediction of molecular interactions between proteins and metabolites, referred to as nodes. The tool provides users with the capability to assess the dynamics of a network's response to disturbances or stimuli applied to a designated target over time (29). In this study, we employed PseudoCell to emulate the behavior of a cell in response to increasing concentrations of CCL11. To this end, we subjected the CCL11 node to various frequencies of activation, including 0% (control), 12.5% (low expression), 25% (medium expression), and 50% (high expression).

The network was then updated for 1,000 cycles, and the simulations were repeated 30 times for each experimental group (n=30).

2.10 Differential gene expression (DGE) and gene ontology (GO) enrichment analysis

Differential gene expression analysis (DGE) was performed using a microarray dataset (GSE18965) (28) through the GEO2R open-source interactive web tool. Were considered differentially expressed (DE) those genes with p <0.05 after Benjamini & Hochberg (False discovery rate, FDR) correction (29). The gene ontology (GO) enrichment analysis for biological process and molecular function were performed for targets that remained differentially expressed after Benjamini & Hochberg FDR correction through GO Consortium (30–32).

2.11 Statistics

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., LaJolla, California). Sample distribution of each group was initially assessed using the Shapiro-Wilk normality test. For comparisons between two groups, the Student t-test was employed for samples with a normal distribution, whereas the Mann-Whitney U-test was used for non-parametric samples. For analyses involving three or more groups, the Ordinary One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was performed for samples with a normal distribution, while the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test was employed for non-parametric samples. The presented data are expressed as median and Interquartile Range (IQR), as specified in each figure's description. Significant differences were considered when P<0.05.

3 Results

3.1 *In silico* stimulation of CCL11 directly promotes oxidative stress, DNA damage and pro-inflammatory pathways

PseudoCell is an open-source regulatory network capable of robustly simulating intricate molecular networks and forecasting potential outcomes following disturbances to specific targets (29). In this study, we employed PseudoCell as a guiding tool for hypothesis formation, enabling us to identify and evaluate the most probable targets that undergo perturbations upon exposure to CCL11 in a complex biological system.

Upon challenging the PseudoCell software with increasing activation frequencies of CCL11, we observed a notable alteration in the network behavior, mainly at the "CCL11 High" group, as demonstrated by the heatmap plot presented in Figure 1A. Notably, increasing Node Activation Frequencies (NAF) of CCL11 induced a dose-dependent overexpression of cytochrome b alpha (CYBA) and beta (CYBB) chains of the protein Cytochrome b-245, responsible for ROS formation (Figures 1B, C). These findings were further

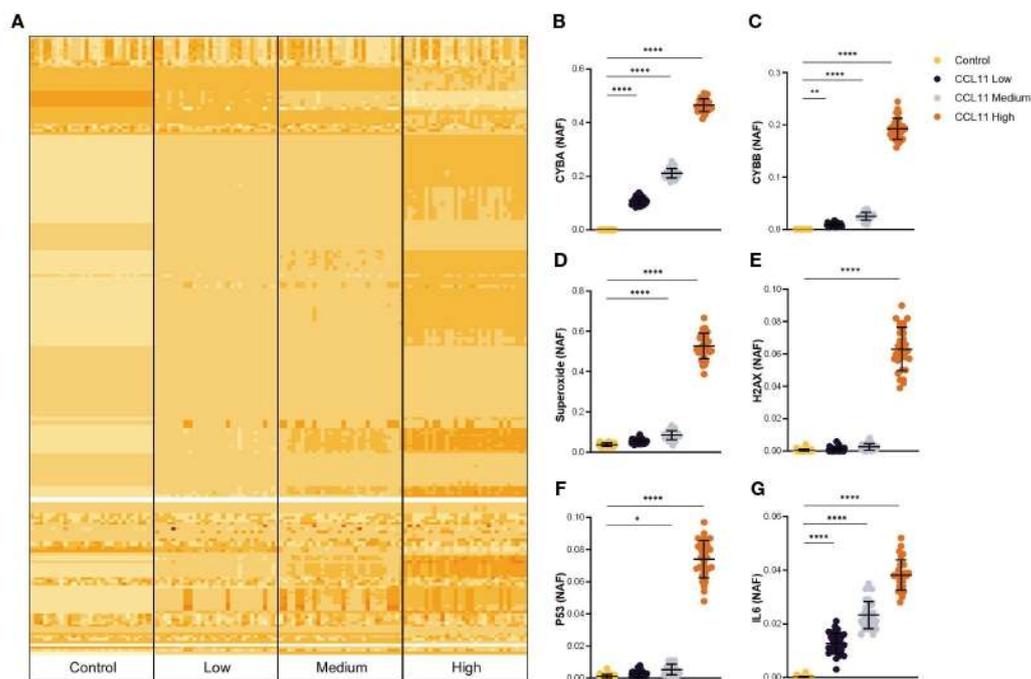


FIGURE 1

In silico prediction of potential targets activated after CCL11 stimuli. (A) Heatmap plot representing alteration in activation frequencies patterns for Control, CCL11 Low, CCL11 Medium and CCL11 High groups. Augmented Node Activation Frequency (NAF) for CYBA (B), CYBB (C), Superoxide (D), H2AX (E), TP53 (F) and IL6 (G) induced by increased *in silico* activation of CCL11. (B–D) Ordinary One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was performed. (E–G) Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test was performed. Data are presented as median and IQR and display 30 independent *in silico* experiments. Significant differences considered when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.0001$ (****).

supported by the overexpression of superoxide at the medium and high CCL11 stimuli conditions (Figure 1D). In addition, we observed that the highest stimuli frequency induced remarkable activation of two important proteins involved in DNA damage signaling, namely the H2A Histone Family Member X (H2AX) and the tumor suppressor protein TP53 (Figures 1E, F). Finally, the CCL11 activation led to a dose-dependent increase in IL6, an essential pro-inflammatory cytokine that is known to increase during aging and composes the senescence-associated secretory phenotype (SASP) (Figure 1G).

3.2 CCL11 induces ROS production in fibroblasts

Given that a hallmark of stress-induced senescence is a shift towards a pro-oxidative phenotype, and our model predicted an increase in oxidative stress after exposure to CCL11, we aimed to validate these results *in vitro*. To this end, we treated the MRC5 human-derived fibroblast cell line with increasing doses of recombinant human CCL11 (rhCCL11) and assessed ROS formation. Our results showed that treatment with the highest dose of rhCCL11 induced overproduction of ROS within 60 minutes, persisting for up to 4 hours (Figures 2A, B) ($p < 0.05$). However, no significant differences were observed in ROS secretion 24 hours after treatment (Figure 2C).

3.3 Increased DNA damage signaling induced by CCL11

To examine whether the pro-oxidative environment observed in MRC5 after treatment with CCL11 could induce DNA damage signaling, we quantified the phosphorylated active forms of H2AX (γ H2AX) and TP53 (phospho-TP53). Our results showed that 2 hours after treatment, there was a significant increase in the percentage ($p < 0.0001$) and mean fluorescence intensity (MFI) ($p = 0.005$) of γ H2AX-positive cells, as well as an increase in the percentage ($p < 0.0001$) and MFI ($p = 0.0352$) of p-p53 expressing cells (Figures 3A, B). These findings suggest that CCL11 can activate DNA damage signaling pathways. Interestingly, the DNA damage response pathways were abrogated 24 hours after treatment, implying that the machinery for DNA repair was able to restore cellular homeostasis (Figures 3C, D).

3.4 CCL11 induces cellular senescence in healthy fibroblasts

Since senescent fibroblasts are involved in deleterious alterations in lung diseases, we sought to evaluate the impact of CCL11 on cellular senescence in the MRC5 human-derived fibroblast cell line. Our results indicate that the 24 hour-treatment with rhCCL11 led to an increase in percentage ($p = 0.0481$) and MFI

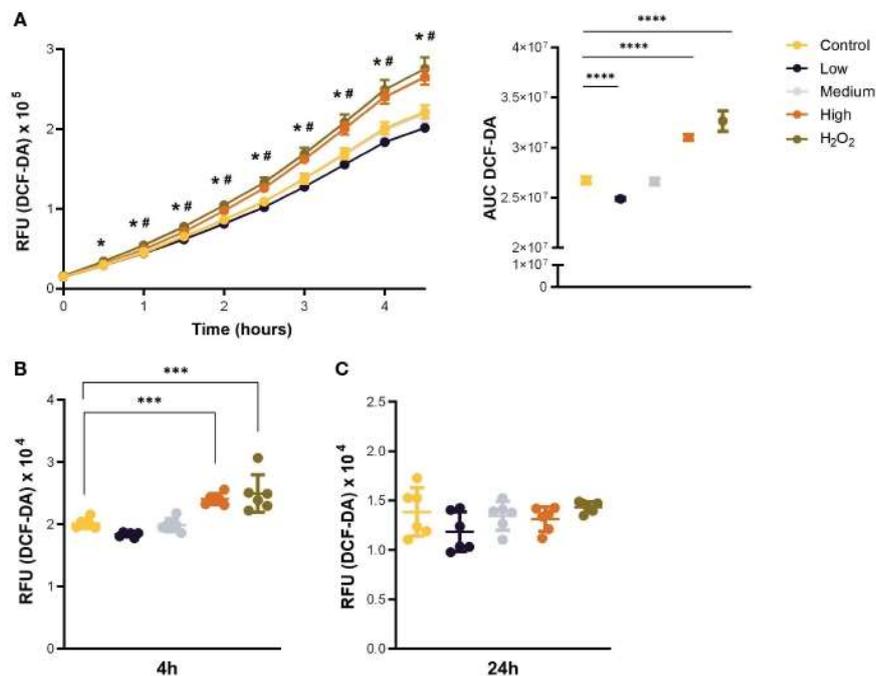


FIGURE 2

Acute stimulation with CCL11 induces ROS overproduction. MRC-5 cells were incubated with low, medium, and high doses (100, 250 and 500ng/10⁵ cells/mL, respectively) of rhCCL11 for 4 hours or 24 hours. **(A)** Increased ROS generation after exposure to rhCCL11 high. Data presented as relative fluorescence units (RFU) emission over time (left), and Area Under the Curve (AUC) (right). Significant differences are shown between Control vs H₂O₂ (*) and Control vs CCL11 High (#). **(B)** Increased ROS production 4 hours after treatment with rhCCL11 high and **(C)** no differences between groups with a 24-hour exposure to rhCCL11. Ordinary One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was performed for all experiments. Data are presented as median and IQR. N = 6 for all groups. Significant differences considered when P<0.05 (*), P<0.001 (***) and P<0.0001 (****).

($p = 0.0229$) of SA- β -gal activity, a widely accepted biomarker of cellular senescence (Figure 4A). Moreover, our findings suggest that even low concentrations of CCL11 can sustain features of cellular senescence after chronic exposure, as evidenced by a similar response in SA- β -gal activity after a 5-day treatment with a ten-times lower dose of rhCCL11 (Figure 4B) ($p = 0.0194$).

Additionally, we observed decrease cell proliferation, represented by reduced Ki-67 expression, in fibroblasts treated with rhCCL11 (Figure 4C) ($p = 0.0192$), another important hallmark of cellular senescence. Notably, there were no significant differences in cell viability between groups 4 hours after treatment with rhCCL11. Decreased viability was only present on the positive control group incubated with 100 μ M H₂O₂ (Figure 4D) ($p = 0.0025$). Collectively, our findings provide evidence that CCL11 is capable of inducing cellular senescence in human lung-derived fibroblasts, which may contribute to pathological extracellular matrix alterations in lung diseases.

3.5 CCL11 induces a pro-inflammatory loop through SASP secretion

To deeper understand the mechanisms underlying the mediation of the inflammatory process by eotaxin-1, we investigated the endogenous production of CCL11 by fibroblasts 24 hours after treatment with the recombinant homologous

chemokine. Our findings revealed a significant increase in CCL11 secretion by fibroblasts pre-treated with CCL11 (Figure 5A) ($p < 0.0001$), indicating the presence of a positive feedback loop and an amplification of the pro-senescent microenvironment promoted by CCL11.

Additionally, we aimed to identify pro-inflammatory cytokines recognized as components of the SASP. Our results showed augmented secretion of IL-6 ($p = 0.0005$) and IL-8 ($p = 0.0008$) (Figures 5B, C) in fibroblasts treated with CCL11 for 24 hours, suggesting their involvement as key elements in the senescence secretome. No significant differences were observed between groups for the remaining cytokines (Figures 4D–G).

3.6 Senescent markers and fibroblast survival pathways are observed in lung of asthmatic patients

To establish a connection between *in silico* and *in vitro* findings with clinical data, we conducted a differential gene expression analysis using a microarray dataset derived from airway epithelial cells (AECs) of children with asthma and healthy non-atopic controls (GSE18965) (Figure 6A). Our primary goal was to investigate the role of epithelial cells in inducing fibroblast senescence and to explore the existence of a pro-senescent environment within the lung parenchyma. Specifically, we focused

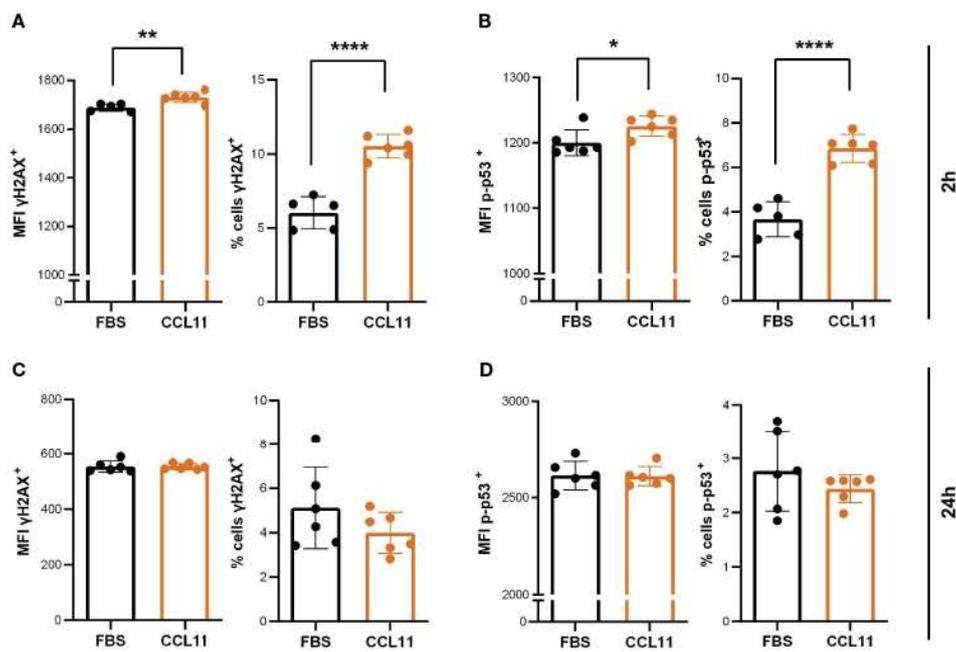


FIGURE 3

CCL11 induces DNA damage mediated by γ H2AX and p-TP53. MRC-5 cells were seeded at 10×10^4 cells/mL and incubated with high doses ($500 \text{ ng}/10^5$ cells/mL) of rhCCL11 for 2h or 24h. We observed increased γ H2AX (A) ($N = 5/6$, respectively) and TP53 (B) ($N = 5/6$) phosphorylation and activation 2h after exposure to rhCCL11. No differences between groups were observed for γ H2AX (C) ($N = 6$) or TP53 (D) ($N = 6$) phosphorylation 24h after treatment (A–D). Unpaired t-test for normal distribution was performed, except for % of cells $p53^+$ data (D), for which Mann-Whitney test was performed. Data are presented as median and IQR. Significant differences considered when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.0001$ (****). MFI, median fluorescence intensity.

on assessing whether there is an upregulation of CCL11 expression in AEC cells, which could potentially function as the primary source of CCL11 due to their direct interface with the lung tissue and allergens, thereby promoting fibroblast senescence.

Our analysis revealed upregulation of eotaxin-1/CCL11 expression in the airway epithelial cells of asthmatic patients. Additionally, we observed increased expression of NADPH oxidase 1 (NOX1) and ATM serine/threonine kinase (ATM), along with decreased vascular endothelial growth factor A (VEGFA) levels. Furthermore, pro-inflammatory markers such as IL18, IL6R, and C-reactive protein (CRP) exhibited elevated expression. Notably, we also identified increased expression of serpin family E member 1 (SERPINE1) and cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A), important mediators of aging (Figure 6B). These findings shed light on the molecular alterations within the airway epithelial cells that may contribute to lung fibroblast premature aging in asthma.

We further conducted a GO enrichment analysis to investigate the primary biological processes triggered by asthma in the lungs of asthmatic patients, which led to the identification of several enriched pathways (Figures 6C, D). Notably, our analysis revealed a significant enrichment of fibroblast survival-related pathways in atopic asthma subjects, prominently including the fibroblast growth factor receptor signaling pathway. These findings further underscore the close interplay between lung epithelial cells and fibroblast dysfunction in the context of asthma.

4 Discussion

In this study, we demonstrated that eotaxin-1/CCL11 was able to induce cellular senescence and sustain a pro-inflammatory response within human embryonic fibroblasts through promotion of oxidative stress-induced DNA damage. Our findings suggest that CCL11 signaling might play a pivotal role in establishing a pro-aging environment in the lungs of asthmatic patients, with resident fibroblasts playing a critical role in this process.

CCL11 is a protein secreted by several cell types in the respiratory tract, including airway epithelial cells, fibroblasts, smooth muscle cells, and macrophages. Its primary function in the airways is to act as a chemoattractant for eosinophils, which can lead to allergen-induced lung eosinophilia (1, 30, 31). Activated eosinophils are a significant source of ROS during asthma exacerbations. Interestingly, ROS production by eosinophils is induced in a dose-dependent manner by CCL11, leading to oxidative damage and lung tissue injury (32, 33). Treating eosinophils with CCR3 antagonists reduces ROS production, emphasizing the role of CCL11 in promoting oxidative stress (33, 34). Our study demonstrates that CCL11 triggers ROS overproduction also in lung-derived fibroblasts, suggesting that this chemokine can promote a pro-oxidative environment by stimulating multiple cellular sources in asthmatic lungs.

At cellular level, ROS can induce DNA oxidative damage, including DNA single-strand breaks (SSBs) or double-strand

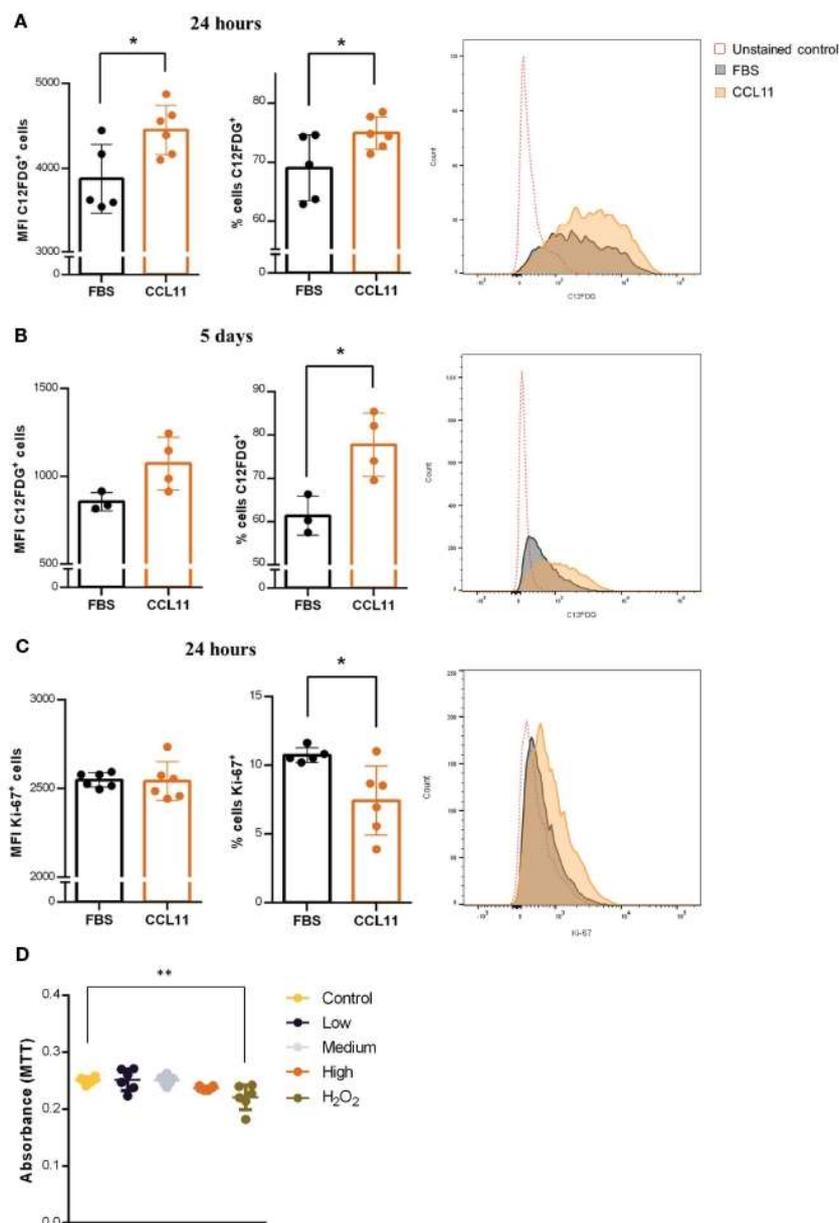


FIGURE 4

Cellular senescence and reduced proliferation induced by CCL11. MRC-5 cells were incubated with high dose (500 ng/10⁵ cells/mL) for 24 hours or low dose (50 ng/mL) of rhCCL11 for 5 days. We observed increased SA-β-Gal activity (C12FDG⁺ cells) cells at 24 hours (A) (N = 5/6) and 5 days (B) (N = 3/4) after exposure to rhCCL11. (C) We also observed reduced number of Ki-67⁺ proliferating cells after the 24-hour treatment (N = 6). (D) No differences in cell viability were observed between the groups exposed to CCL11 (N=6). (A–C) Unpaired t-test for normal distribution was performed. (D) Ordinary One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Data are presented as median and IQR. Significant differences considered when P<0.05 (*) or P<0.01 (**).

breaks (DBSs). To prevent the propagation of deleterious mutations, cells employ a complex system known as the DNA damage response (DDR). This system promotes the mobilization of various molecular components to either facilitate DNA damage repair or prevent cell replication by inducing apoptosis or senescence (35).

Upon detection of SSBs or DSBs, the cell orchestrates the recruitment of specific protein kinases such as ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR) and ataxia-telangiectasia mutated (ATM), respectively (36). Upon recruitment to the lesion

sites, these kinases trigger the phosphorylation and activation of H2AX, culminating in the formation of γH2AX. This activated variant is translocated to the DNA damage sites amplifying the DDR response (36). Moreover, DNA damage kinases are involved in phosphorylation of TP53, a pivotal regulator of cell cycle arrest and cellular senescence (37).

Notably, our findings support this intricate interplay between ROS overproduction and the promotion of DNA damage in triggering cellular senescence following exposure to CCL11. Although in the present study we did not use inhibitors to support a direct evidence

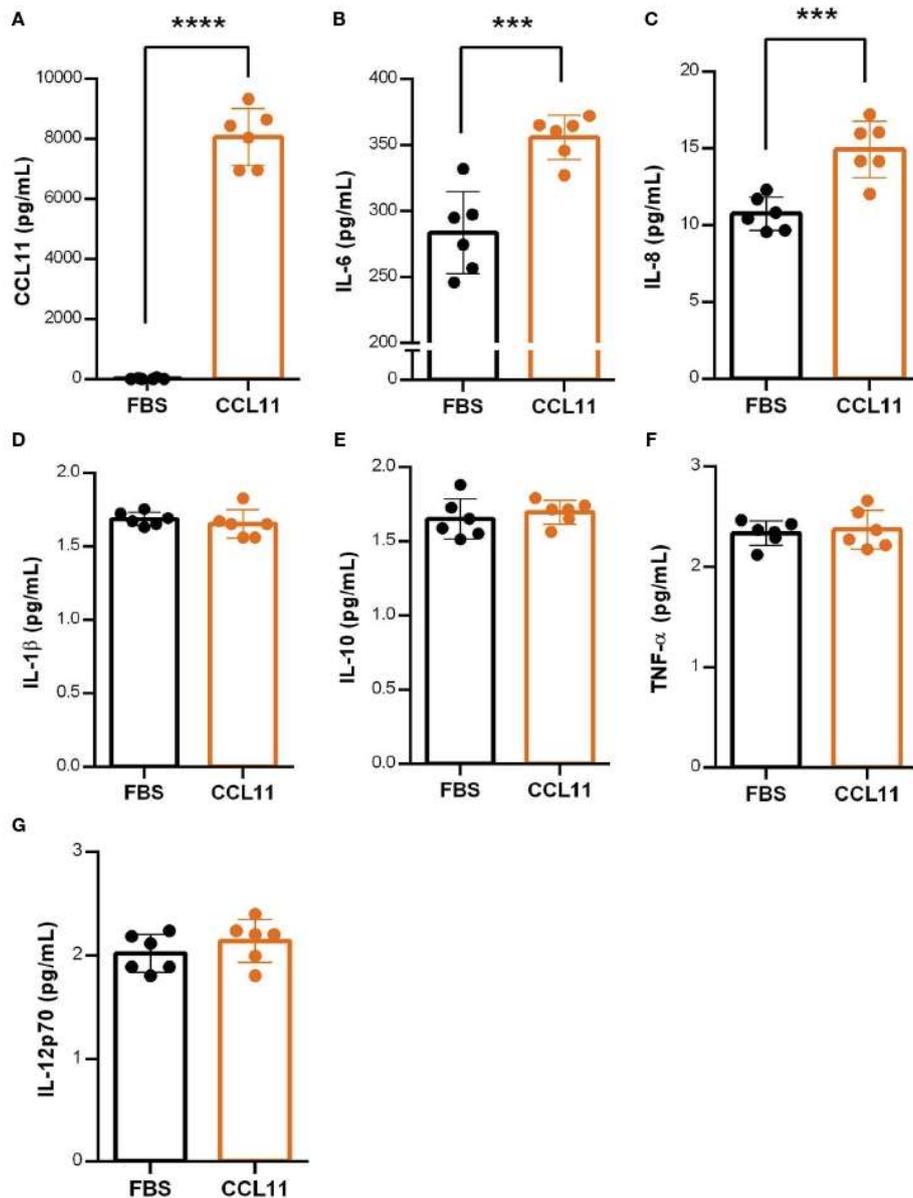


FIGURE 5

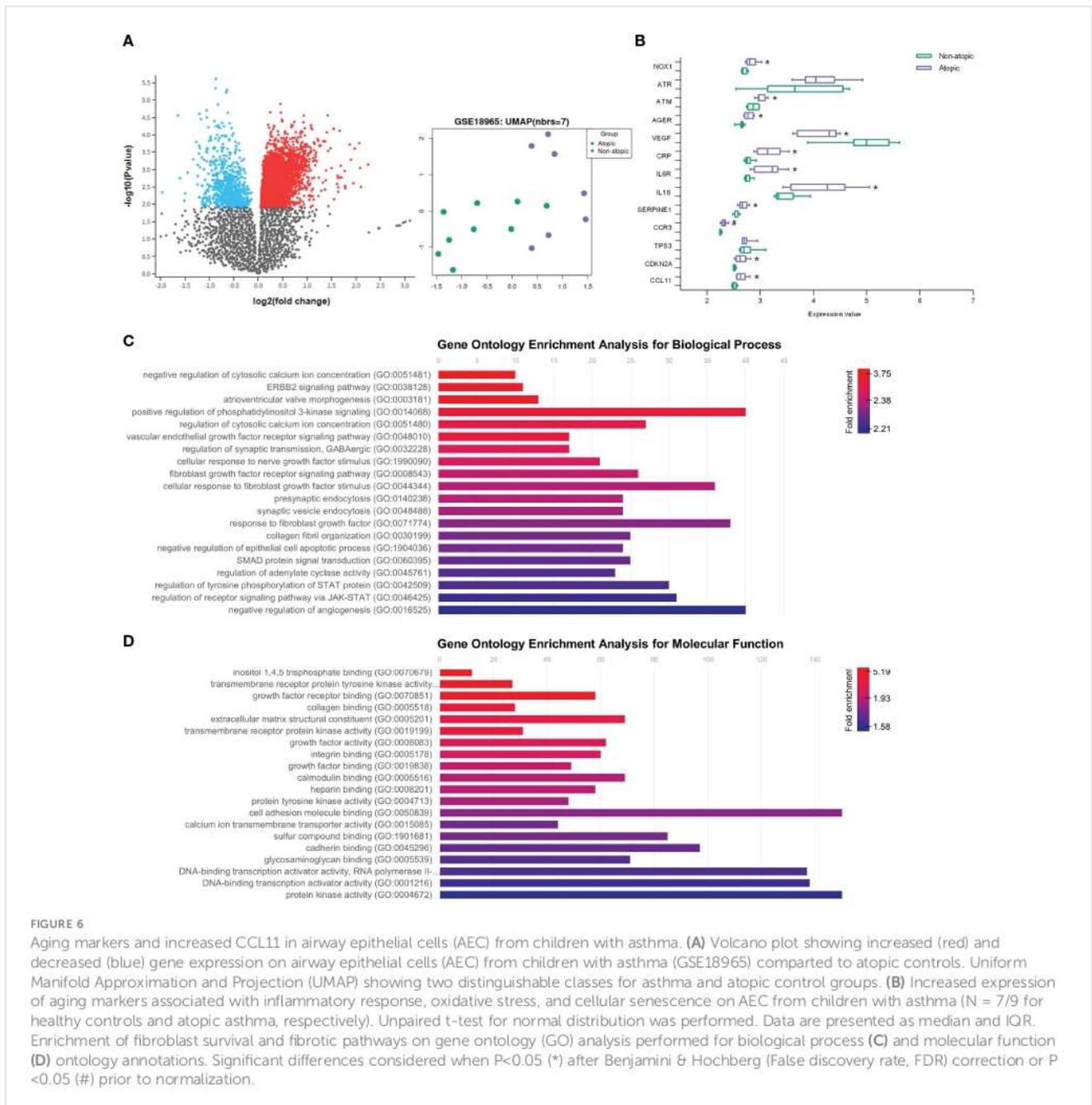
CCL11 induces positive feedback on CCL11 secretion and increases SASP mediators. MRC-5 cells were pre-treated with rhCCL11 ($500\text{ng}/10^5$ cells/mL) for 24 hours and supernatant was replaced for fresh media without rhCCL11 for additional 24 hours for cytokine secretion quantification. (A) Increased CCL11 secretion on cells pre-treated with rhCCL11 evaluated by ELISA. (B–G) Increased secretion of the SASP cytokines IL-6 and IL-8 after 24 hours treatment, with no differences observed in the remained cytokines ($N = 6$). (A) Mann-Whitney U-test for non-parametric samples was performed. (B–G) Unpaired t-test for normal distribution was performed. Data are presented as median and IQR. Significant differences considered when $P < 0.001$ (***) or $P < 0.0001$ (****).

and causal relationship between ROS overproduction and DDR signaling, our findings reveal a simultaneous rise in ROS levels, and H2AX and TP53 activation through phosphorylation, in the lung fibroblast cell line MRC-5 when exposed to CCL11. Therefore, we hypothesize that ROS production may act as a trigger for senescence induction by promoting DNA damage.

Moreover, the enhanced expression of *ATM* in airway epithelial cells of asthmatic children provides additional evidence of DNA damage establishment within the lungs, highlighting its pivotal role as a stress-induced mechanism operating across diverse cell types in the context of asthma.

Additionally, previous studies from our group revealed that ROS depletion by N-Acetyl Cysteine (NAC) partially prevented γ H2AX activation induced by CCL11 in PBMC, reinforcing that ROS might play an important role in the mechanism underlying CCL11-induced effects (29). Therefore, it seems that ROS is not only present but essential for the establishment of a persistent DDR leading to premature aging.

Regarding the role of CCL11 in inducing premature aging within the context of asthma, we have shown a decrease in telomere length in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) accompanied by an increased expression of eotaxin-1/CCL11 in



plasma samples from severe asthma patients. Intriguingly, we also observed an inverse correlation between CCL11 levels and telomere length, implying that high concentrations of this chemokine may lead to telomere shortening (11). These results suggest that CCL11 may contribute to the premature aging in severe asthma patients and highlight the importance to further elucidate the underlying mechanisms involved on this process.

Interestingly, ROS also appears to play a pivotal role in premature senescence mediated by telomere shortening, which also contributes to persistent DDR (38, 39). Previous research has demonstrated a consistent increase in the telomere shortening rate

under increased oxidative stress (10). Additionally, antioxidant treatments, such as ascorbic acid 2-O-phosphate and the free-radical scavenger α -phenyl-t-butyl-nitron, prevented premature aging and extended the lifespan of human endothelial and fibroblast cells (40, 41).

Further supporting the role of CCL11 in promoting cellular senescence, we observed an increased expression of SASP markers, exemplified by augmented IL-6 and IL-8 secretion in fibroblasts exposed to CCL11. These findings are consistent with previous observations that have highlighted IL-6 and IL-8 as the primary cytokines released by senescent fibroblasts undergoing proliferative

exhaustion, indicating their pivotal role as mediators of SASP (42). Notably, there are reports pointing out that CCL11 can also induce the secretion of IL-8 and GM-CSF in bronchial epithelial cells, suggesting its ability to promote cytokine upregulation in different populations (43). Furthermore, our data reveals enhanced expression of IL6R and CRP in AECs derived from atopic-asthma patients. Interestingly, a positive correlation exists between these inflammatory markers and CCL11 (Supplementary Figures 1F, G), implying the potential role of eotaxin-1 as a mediator of the pro-inflammatory milieu observed within the lungs of individuals with asthma.

Finally, we aimed to investigate the contribution of epithelial cells with CCL11 production and the extent to which senescence impacts the lung parenchyma. Specifically, we focused on determining whether airway epithelial cells (AECs) exhibit an elevated expression of CCL11, potentially establishing them as a primary source of this cytokine. Additionally, we sought to evaluate the expression of aging markers within AECs, providing insights into the involvement of senescence in asthma-related lung dysfunction.

Our investigations revealed an increase in CCL11 expression in AEC cells, implying their substantial contribution to CCL11 secretion. Given the strategic location of AECs as intermediaries between lung tissue and allergens, their capacity to induce fibroblast senescence holds significant implications for lung health and function. Furthermore, our observations unveiled the establishment of a pro-senescent milieu in AEC of asthmatic patients, as evidenced by elevated expressions of SERPINE1 and CDKN2A (p16INK4a). These findings emphasize the relevance of senescence in the context of asthma, suggesting a potential positive feedback loop between senescent epithelial cells and fibroblasts. This interplay may play a crucial role in the deterioration of lung function.

Moreover, our study further explores the role of CCL11 as a pro-aging factor in the context of asthma, as evidenced by decreased VEGF expression in AEC of asthmatic patients. This observation holds particular relevance due to the established link between reduced VEGF expression and aging, which is often accompanied by compromised angiogenesis (44, 45). Notably, our investigation also revealed an inverse correlation between VEGF expression and CCL11 levels, further emphasizing the role of this chemokine in the aging process (Supplementary Figure 1E).

Furthermore, our results showed an upregulation of NOX1 expression in AEC from children with asthma, which directly correlates with the increased levels of CCL11 (Supplementary Figure 1A). NOX1 is responsible for the catalytic transfer of oxygen and superoxide and hydrogen peroxide generation. NOX-family members are described as major cellular sources of ROS, and NOX1-derived ROS are involved in many stress-induced outcomes, suggesting that ROS production through NOX1 could be involved in lung tissue dysfunction and senescence (46, 47). Additionally, the heightened expression of ATM, a crucial initiator of DDR after DSBs, associated with the positive correlation observed between

ATM and CCL11 in AECs (Supplementary Figure 1C), further supports the idea that oxidative stress in asthmatic lungs can induce DNA oxidative damage.

In conclusion, our findings illustrate that eotaxin-1/CCL11 has the capability to induce excessive ROS production in lung fibroblasts. This, in turn, is likely to activate various DDR pathways, which might lead to cellular senescence and the amplification of the pro-inflammatory response. Furthermore, our data reveal an increased expression of multiple aging markers within AECs from atopic asthma patients, accompanied by heightened CCL11 secretion. These observations suggest the establishment of a pro-senescent milieu that appears to drive a premature aging process in the context of asthma, aggravated by fibroblast dysfunction.

Data availability statement

The original codes used in the analyses of this study are publicly available. This data can be found here: <https://github.com/viniciuspierdona/pseudocell>.

Ethics statement

Ethical approval was not required for the studies on humans in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used. Ethical approval was not required for the studies on animals in accordance with the local legislation and institutional requirements because only commercially available established cell lines were used.

Author contributions

PL and FB-T conceived and planned the experiments. PL, VP, RM and LG carried out the experiments. PL wrote the manuscript with support from VP, RM, LG, FG and FB-T. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Funding

This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and developed in a partnership between Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). PL received a scholarship from CNPq. VP and LG received a scholarship from CAPES. This FG and FB-T are investigators from CNPq.

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.

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.

Supplementary material

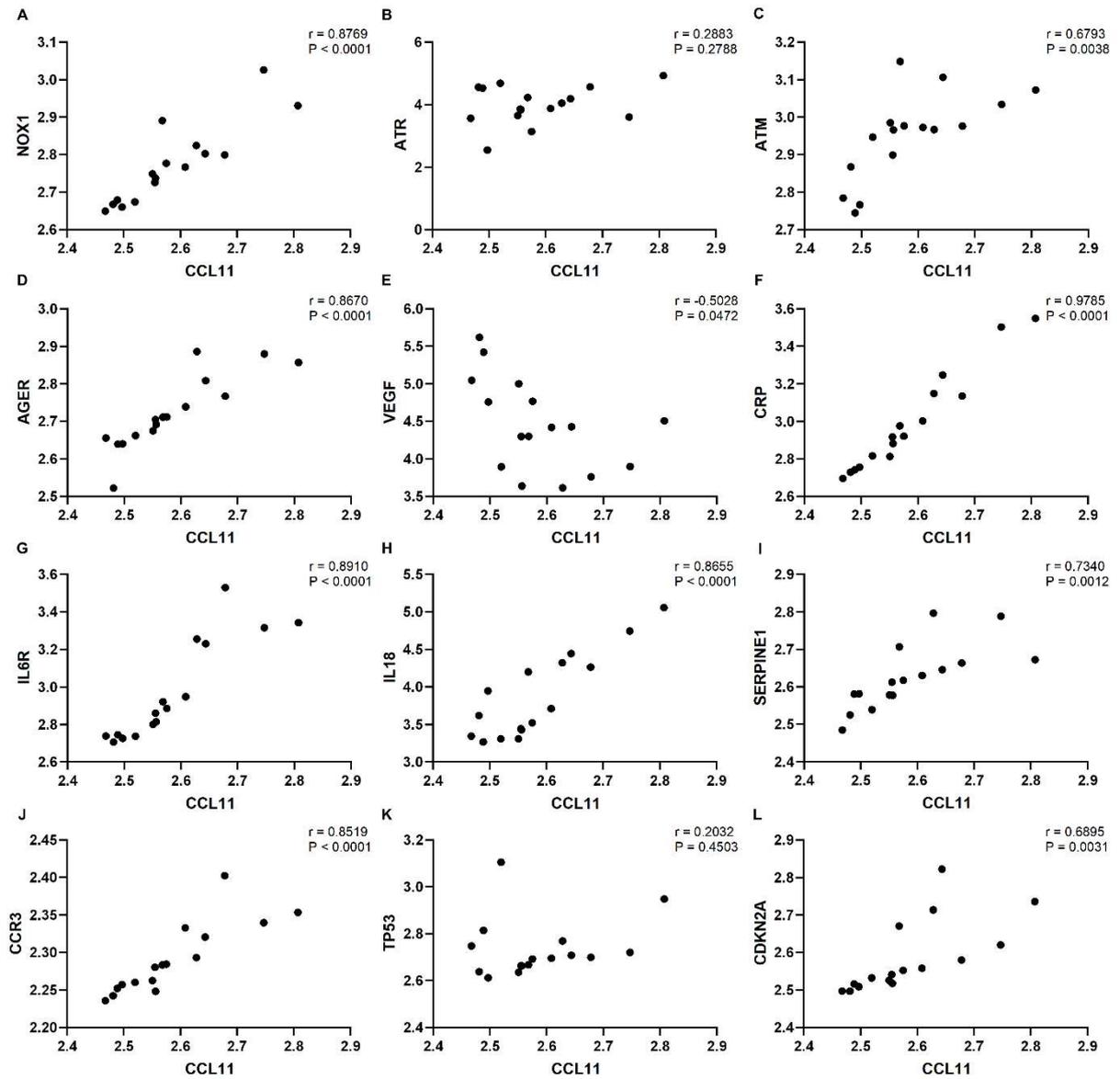
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1243537/full#supplementary-material>

References

- Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. *Nat Rev Dis Primers* (2015) 1(1):15025. doi: 10.1038/nrdp.2015.25
- Papi A, Brightling C, Pedersen SE, Reddel HK. Asthma. *Lancet* (2018) 391(10122):783–800. doi: 10.1016/S0140-6736(17)33311-1
- Abbafati C, Abbas KM, Abbasi-Kangevari M, Abd-Allah F, Abdelalim A, Abdollahi M, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* (2020) 396(10258):1204–22. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30925-9
- Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, et al. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* (1992) 326(5):298–304. doi: 10.1056/NEJM199201303260504
- Fahy JV. Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(1):57–65. doi: 10.1038/nri3786
- Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH, et al. Mucosal inflammation in asthma. *American Review of Respiratory Disease* (2012) 142(2):434–57. doi: 10.1164/ajrccm/1422434
- Crosby JR, Shen HH, Borchers MT, Justice JP, Ansary T, Lee JJ, et al. Ectopic expression of IL-5 identifies an additional CD4+ T cell mechanism of airway eosinophil recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2002) 282(1):99–108. doi: 10.1152/ajplung.2002.282.1.L99
- Barnes P. Similarities and differences in inflammatory mechanisms of asthma and COPD. *Breathe* (2011) 7(3):229–38. doi: 10.1183/20734735.026410
- Ying S, Robinson DS, Meng Q, Rottman J, Kennedy R, Ringler DJ, et al. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *Eur J Immunol* (1997) 27(12):3507–16. doi: 10.1002/eji.1830271252
- Daldegan MB, Teixeira MM, Talvani A. Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF- α in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Braz J Med Biol Res* (2005) 38(9):1359–65. doi: 10.1590/S0100-879X2005000900010
- Barbé-Tuana FM, Grun LK, Pierdoná V, Parisi MM, Friedrich F, Guma FTFCR, et al. Shorter telomeres in children with severe asthma, an indicative of accelerated aging. *Aging (Albany NY)* (2021) 13(2):1686. doi: 10.18632/aging.202527
- Huau F, Gharraee-Kermani M, Liu T, Morel V, McGarry B, Ullenbruch M, et al. Role of eotaxin-1 (CCL11) and CC chemokine receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *Am J Pathol* (2005) 167(6):1485–96. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61235-7
- Puxeddu I, Bader R, Piliponsky AM, Reich R, Levi-Schaffer F, Berkman N. The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 117(1):103–10. doi: 10.1016/j.jaci.2005.08.057
- Hoefler J, Luger M, Dal-Pont C, Culig Z, Schennach H, Jochberger S. The 'Aging factor' Eotaxin-1 (CCL11) is detectable in transfusion blood products and increases with the donor's age. *Front Aging Neurosci* (2017) 9:402. doi: 10.3389/fnagi.2017.00402
- Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* (2011) 477(7362):90–6. doi: 10.1038/nature10357
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonina T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* (2011) 479(7372):232–6. doi: 10.1038/nature10600
- Ogrodnik M, Salmonowicz H, Jurk D, Passos JF. Expansion and cell-cycle arrest: common denominators of cellular senescence. *Trends Biochem Sci* (2019) 44(12):996–1008. doi: 10.1016/j.tibs.2019.06.011
- Sharpless NE, Sherr CJ. Forging a signature of *in vivo* senescence. *Nat Rev Cancer* (2015) 15(7):397–408. doi: 10.1038/nrc3960
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (1995) 92(20):9363–7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363
- McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol* (2018) 217(1):65–77. doi: 10.1083/jcb.201708092
- Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* (2013) 75:685–705. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183653
- Brandenberger C, Mühlfeld C. Mechanisms of lung aging. *Cell Tissue Res* (2017) 367(3):469–80. doi: 10.1007/s00441-016-2511-x
- Calhoun C, Shivshankar P, Saker M, Sloane LB, Livi CB, Sharp ZD, et al. Senescent cells contribute to the physiological remodeling of aged lungs. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* (2016) 71(2):153–60. doi: 10.1093/geron/glu241
- Woldhuis RR, Heijink IH, Van Den Berge M, Timens W, Oliver BGG, De Vries M, et al. COPD-derived fibroblasts secrete higher levels of senescence-associated secretory phenotype proteins. *Thorax* (2021) 76(5):508–11. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-215114
- Wrench C, Baker J, Fenwick P, Donnelly L, Barnes P. Small airway fibroblasts from COPD patients are senescent and pro-fibrotic. *Eur Respir J* (2018) 52(suppl 62):PA2172. doi: 10.1183/13993003.congress-2018.PA2172
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* (2010) 29(2):273–83. doi: 10.1007/s10555-010-9220-9
- Jesnak M, Zelieskova M, Babusikova E. Oxidative stress and bronchial asthma in children—Causes or consequences? *Front Pediatr* (2017) 5:162. doi: 10.3389/fped.2017.00162
- Guo J, Schupf N, Mayeux RP, Gu Y. Reproducibility of serum cytokines in an elderly population. *Immun Ageing* (2020) 17(1):1–10. doi: 10.1186/s12979-020-00201-0
- Pierdoná V, Lavandoski P, Moura Maurmann R, Borges GA, Carlos J, Mombach M, et al. PseudoCell: A collaborative network for *in silico* prediction of regulatory pathways. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2023.07.20.549793v2
- Pease JE, Williams TJ. Eotaxin and asthma. *Curr Opin Pharmacol* (2001) 1(3):248–53. doi: 10.1016/S1471-4892(01)00044-3
- Garcia-Zepeda EA, Rothenberg ME, Ownbey RT, Celestin J, Leder P, Luster AD. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med* (1996) 2(4):449–56. doi: 10.1038/nm0496-449
- Honda K, Chihara J. Eosinophil activation by eotaxin – eotaxin primes the production of reactive oxygen species from eosinophils. *Allergy* (1999) 54(12):1262–9. doi: 10.1034/j.1398-9995.1999.00170.x
- Ho WE, Cheng C, Peh HY, Xu F, Tannenbaum SR, Ong CN, et al. Anti-malarial drug artesunate ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma. *Free Radic Biol Med* (2012) 53(3):498–507. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.021
- Sannohe S, Adachi T, Hamada K, Honda K, Yamada Y, Saito N, et al. Upregulated response to chemokines in oxidative metabolism of eosinophils in asthma and allergic rhinitis. *Eur Respir J* (2003) 21(6):925–31. doi: 10.1183/09031936.03.00028103a
- Panieri E, Gogvadze V, Norberg E, Venkatesh R, Orrenius S, Zhivotovskiy B. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence. *Free Radic Biol Med* (2013) 57:176–87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.024
- D'Adda Di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* (2008) 8(7):512–22. doi: 10.1038/nrc2440

37. Muñoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15(7):482–96. doi: 10.1038/nrm3823
38. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* (2002) 27(7):339–44. doi: 10.1016/S0968-0004(02)02110-2
39. Hewitt G, Jurk D, Marques FDM, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, et al. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun* (2012) 3(1):1–9. doi: 10.1038/ncomms1708
40. Von Zglinicki T, Pilger R, Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* (2000) 28(1):64–74. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00207-5
41. Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E, Miwa N. Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* (1998) 63(11):935–48. doi: 10.1016/S0024-3205(98)00351-8
42. Pitozzi V, Mocali A, Laurenzana A, Giannoni E, Cifola I, Battaglia C, et al. Chronic resveratrol treatment ameliorates cell adhesion and mitigates the inflammatory phenotype in senescent human fibroblasts. *Journals Gerontology: Ser A* (2013) 68(4):371–81. doi: 10.1093/gerona/gls183
43. Cui CH, Adachi T, Oyamada H, Kamada Y, Kuwasaki T, Yamada Y, et al. The role of mitogen-activated protein kinases in eotaxin-induced cytokine production from bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2002) 27(3):329–35. doi: 10.1165/rcmb.4762
44. Ito Y, Betsuyaku T, Nagai K, Nasuhara Y, Nishimura M. Expression of pulmonary VEGF family declines with age and is further down-regulated in lipopolysaccharide (LPS)-induced lung injury. *Exp Gerontol.* (2005) 40(4):315–23. doi: 10.1016/j.exger.2005.01.009
45. Ahluwalia A, Jones MK, Tarnawski AS. Key role of endothelial importin- α in VEGF expression and gastric angiogenesis: Novel insight into aging gastropathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2014) 306(4):G338–45. doi: 10.1152/ajpgi.00382.2013
46. Kato M, Marumo M, Nakayama J, Matsumoto M, Yabe-Nishimura C, Kamata T. The ROS-generating oxidase Nox1 is required for epithelial restitution following colitis. *Exp Anim* (2016) 65(3):197–205. doi: 10.1538/expanim.15-0127
47. Kumari R, Jat P. Mechanisms of cellular senescence: cell cycle arrest and senescence associated secretory phenotype. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:485. doi: 10.3389/fcell.2021.645593

Supplementary material.



Supplementary Figure 1 | Correlation between CCL11 and aging or inflammatory genes from airway epithelial cells (AEC) of a pediatric cohort (GSE18965) (N = 16). Data are represented by Pearson's correlation coefficient (r). Significant differences considered when $P < 0.05$.

II.2. Capítulo 2: “Beyond Respiratory Impacts: Exploring Social Alterations in a House Dust Mite-Induced Chronic Asthma Model”.

(Artigo em preparação)

JUSTIFICATIVA: A asma apresenta-se como uma condição de caráter pró-inflamatório crônico proeminente. Evidências crescentes sugerem que a inflamação sistêmica possa atuar como um preditor importante de declínio cognitivo e desenvolvimento de condições psiquiátricas como ansiedade e depressão. Porém, existem poucos estudos voltados a compreensão causal entre a asma enquanto condição inflamatória e a manifestação de alterações cognitivas. Portanto, faz-se necessária uma maior compreensão acerca do impacto da asma na promoção de alterações cognitivo-comportamentais a nível de sistema nervoso central.

PARTE III

III.1. DISCUSSÃO

O envelhecimento é definido como um processo universal de declínio funcional progressivo, resultando em um aumento da vulnerabilidade do organismo (Franceschi et al., 2000; López-Otín et al., 2013). Esse fenômeno multifatorial pode ser compreendido pelo acúmulo gradual de diferentes marcadores biológicos, os quais se manifestam por meio de alterações fisiológicas e celulares que culminam na ruptura da homeostase tecidual. Nesse cenário, consolida-se o comprometimento da capacidade do organismo de promover respostas adaptativas responsáveis pela manutenção da resposta fisiológica sob estresse, aumentando a predisposição ao desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento como câncer, DM2, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (A Singer, 2016; López-Otín et al., 2013, 2023).

A nível tecidual, o principal expoente do envelhecimento manifesta-se pelo acúmulo excessivo de células senescentes. A senescência celular é caracterizada pela perda irreversível da capacidade proliferativa da célula mediante estímulos mitogênicos e pelo estabelecimento de um secretoma próprio. Dentre os principais marcadores da senescência celular estão o aumento da atividade da SA- β -Gal, a elevação da expressão de inibidores de ciclinas como p21^{CIP1}, a proteína inibidora de quinase dependente de ciclina 2A (p16^{INK4a}) e TP53, o aumento de tamanho celular acompanhado pela aquisição de uma morfologia mais achatada e o incremento na secreção de diversos elementos do SASP, como IL-6 e IL-8 (Campisi et al., 2011; Hernandez-Segura et al., 2018). A senescência celular pode ser desencadeada por uma ampla variedade de estímulos, como o atrito telomérico associado à exaustão replicativa, o acúmulo de dano ao DNA, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo ou mesmo exposição a citocinas presentes no SASP, que acabam por propagar o fenótipo senescente de forma parácrina (Correia-Melo et al., 2014; Wang et al., 2020).

Com o avanço da idade, ocorre ainda o estabelecimento de uma resposta inflamatória disfuncional denominada *inflammaging*. Esse fenótipo é caracterizado como um estado pró-inflamatório crônico, sistêmico e de baixo grau, que se manifesta pelo aumento basal no nível de diferentes citocinas inflamatórias na circulação, tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α . Esse fenômeno deriva principalmente da perda da capacidade do sistema imune de manter a homeostase mediante o acúmulo de estresse (Franceschi et al., 2000). Em sua atualização mais recente dos “*Hallmarks of aging*”, López-Otín e colaboradores (2023) propõem a inflamação crônica como um marcador adicional do envelhecimento a partir da compreensão de que esta aumenta ubiquamente com o avanço da idade. Ainda, os autores propõem que a inflamação se estabelece como desfecho progressivo decorrente do acúmulo excessivo dos demais marcadores de envelhecimento no organismo (Franceschi et al., 2000; Holgate et al., 2015; López-Otín et al., 2023).

De fato, a inflamação crônica se estabelece como processo fisiopatológico subjacente ao desenvolvimento de diversas doenças associadas ao envelhecimento, tais como doenças cardiovasculares, fibrose pulmonar, obesidade, doenças neurodegenerativas e câncer (Campisi et al., 2011; Franceschi & Campisi, 2014b; Frasca et al., 2017). Ademais, além de aumentar a fragilidade do organismo, a persistência de um fenótipo pró-inflamatório crônico parece desempenhar um papel central na indução e perpetuação da senescência celular. De fato, evidências sugerem que o acúmulo de células senescentes se relaciona diretamente com o declínio funcional observado nas condições inflamatórias mencionadas anteriormente (López-Otín et al., 2023), destacando a íntima relação entre ambos os fenômenos.

A relação entre inflamação e senescência parece representar um cenário de causalidade cíclica, em que a senescência atua simultaneamente como causa e consequência da inflamação. Evidenciando essa associação, uma alteração sistematicamente observada durante o processo de envelhecimento é a hiperativação do complexo proteico fator nuclear kappa B (*nuclear*

factor-kappa B – NF-κB). O NF-κB é um fator de transcrição responsável pela expressão de uma ampla seleção de citocinas pró-inflamatórias, que coletivamente compõem quase a totalidade SASP. Portanto, compreende-se hoje a ativação de NF-κB como um efetor central do SASP, perpetuando a inflamação crônica associada ao envelhecimento (Hernandez-Segura et al., 2018). Porém, além de promover o fenótipo secretor associado a senescência, esse complexo também parece ser responsável pelo estabelecimento da senescência *per se*.

Nesse contexto, Tilstra e colaboradores (2012) demonstraram experimentalmente que a depleção de um alelo da subunidade p65 de NF-κB em camundongos foi capaz de postergar o surgimento de sintomas associados ao envelhecimento, incluindo tremores, cifose, sarcopenia, incontinência urinária (sintomas associados a neurodegeneração), esteatose hepática, osteoporose, entre outros. Além disso, a inibição de NF-κB em fibroblastos embrionários murinos primários submetidos a um protocolo de indução de senescência por estresse oxidativo, mostrou-se capaz de prevenir o acúmulo de células senescentes, reduzindo a expressão de diferentes marcadores de senescência celular como γH2AX, p16^{INK4a} e a atividade da enzima SA-β-Gal (Tilstra et al., 2012).

Interessantemente, a inflamação crônica destaca-se como elemento central na fisiopatologia da asma, indicando que a senescência celular poderia representar um desfecho importante também nessa condição. Endossando essa hipótese, constatou-se que a linfopoietina estromal tímica (*thymic stromal lymphopoietin* – TSLP), essencial para o estabelecimento da resposta Th2 na asma alérgica, atua também como um indutor da senescência celular. Inicialmente, observou-se que o aumento da expressão de TSLP no epitélio respiratório de pacientes asmáticos é acompanhado pela expressão elevada de proteínas associadas a senescência, como p16^{INK4a} e p21^{CIP1}, além da redução da atividade proliferativa mediada por Ki-67, cuja expressão encontra-se tipicamente reduzida em células senescentes. Objetivando averiguar a existência de uma relação de causalidade entre ambos os fenômenos, Wu e

colaboradores (2013) estimularam células epiteliais bronquiais da linhagem BEAS-2B com TSLP e verificaram a indução de senescência celular mediada por p16^{INK4a} e p21^{CIP1}, com aumento da atividade da enzima SA-β-Gal e redução da capacidade proliferativa (Wu et al., 2013). Portanto, é possível inferir que a citocina TSLP, conhecida por desempenhar um papel crucial no estabelecimento da asma alérgica, também atua promovendo o acúmulo de células senescentes no epitélio pulmonar.

Ainda, alguns estudos sugerem que a asma representa uma condição capaz de induzir encurtamento telomérico acelerado. Os telômeros consistem em sequências repetitivas de pares de base, representadas pelo conjunto TTAGGG em humanos, localizadas nas extremidades dos cromossomos. Essa estrutura atua na proteção do DNA contra danos, garantindo a manutenção da integridade genômica. Uma característica crucial dos telômeros, que os distingue como marcadores de envelhecimento, é o encurtamento progressivo e cumulativo que essa sequência em tandem sofre a cada divisão celular, conferindo a ela o título de relógio biológico. Porém, após um número limitado de divisões, os telômeros atingem um comprimento crítico, no qual perdem sua capacidade de proteger o genoma contra degradação nucleolítica. Isso resulta no acúmulo de danos na molécula de DNA e na ativação da resposta ao dano ao DNA, levando à interrupção do ciclo celular e à transcrição de genes associados a senescência celular (Blackburn et al., 2015; Wan et al., 2023; Wang et al., 2020).

Examinando a asma sob a perspectiva do envelhecimento precoce, Salem e colaboradores (2015) observaram uma redução no comprimento telomérico absoluto de fibroblastos bronquiais isolados de pacientes asmáticos em relação a controles eutróficos, concomitantemente ao aumento na atividade da enzima SA-β-Gal (Hadj Salem et al., 2015). Ainda, um trabalho publicado por Kyoh *et al.* (2013) evidencia a ocorrência da redução no comprimento telomérico em PBMC de pacientes com asma grave, mas não em indivíduos com asma moderada ou leve, associando o grau de comprometimento telomérico com a gravidade

da doença (Kyoh et al., 2013). Ademais, observou-se uma associação entre encurtamento telomérico e a redução do fluxo expiratório máximo em crianças, sugerindo o papel do envelhecimento celular no comprometimento funcional prematuro do tecido pulmonar (Henckel et al., 2018).

Finalmente, em uma publicação anterior, nosso grupo evidenciou a correlação entre o aumento na expressão da eotaxina-1/CCL11 – uma quimiocina central no recrutamento de eosinófilos para os pulmões de pacientes com asma alérgica – e a redução do comprimento telomérico em PBMC de indivíduos diagnosticados com asma grave (Barbé-Tuana et al., 2021). Esses resultados sugerem a importância da inflamação, manifestado pelo aumento da secreção periférica da quimiocina CCL11, no estabelecimento de um fenótipo de envelhecimento prematuro em pacientes com asma.

Porém, apesar da crescente percepção de que a eotaxina-1/CCL11 possa desempenhar um papel importante como mediadora do envelhecimento, o seu protagonismo na indução da senescência celular ainda não havia sido descrito. Portanto, os resultados apresentados no capítulo 1 desta tese fornecem evidências importantes para a elucidação do papel do CCL11 no envelhecimento. Nesse sentido, demonstramos que a exposição de fibroblastos pulmonares humanos da linhagem MRC5 a moléculas de CCL11 recombinante (rhCCL11) foi capaz de induzir senescência celular, evidenciado pelo aumento da atividade da enzima SA- β -Gal e pela redução da capacidade proliferativa mediada por Ki-67.

Reforçando a pervasividade do fenótipo senescente, observamos também um aumento na secreção das citocinas IL-6 e IL-8, mediadores importantes do SASP, em células expostas a CCL11. O SASP é atualmente compreendido como um fenômeno heterogêneo, variando de acordo com diferentes programas de senescência ou tipos celulares. No entanto, resultados prévios obtidos a partir da indução de senescência por exposição a H₂O₂ em células da linhagem MRC5 evidenciam a expressão do SASP também via secreção elevada de IL-6 e IL-8,

sugerindo que essas citocinas representam a assinatura do fenótipo secretor associado a senescência nesse tipo celular (Yang et al., 2018).

Complementarmente, demonstramos que a indução do fenótipo senescente por CCL11 parece ocorrer mediante a liberação de ROS e o acúmulo de dano ao DNA, expresso pela elevação de γ H2AX e TP53. Essa relação encontra plausibilidade biológica na literatura vigente, a qual postula que a elevação na produção de espécies reativas de oxigênio promove alterações responsáveis pela ruptura da homeostase da molécula de DNA, levando ao recrutamento de proteínas quinase específicas que culminam na fosforilação e formação de γ H2AX e TP53. A ativação de γ H2AX e TP53 culmina na interrupção do ciclo celular e, caso o dano persista, pode induzir a transição fenotípica para um estado de senescência celular (Correia-Melo et al., 2014; D'Adda Di Fagagna, 2008b; Renaudin, 2021).

Em suma, esses dados sugerem que a exposição de fibroblastos saudáveis a CCL11 resulta em aumento do estresse oxidativo e acúmulo de dano no DNA. Nesse contexto, a célula desencadeia o recrutamento da maquinaria de reparo, representada por γ H2AX e TP53, podendo culminar em dois desfechos: o reparo bem-sucedido do dano, permitindo que a célula retome sua função homeostática normal, ou o acúmulo excessivo de dano, levando à diferenciação da célula para um estado senescente, visando evitar a propagação de mutações e prevenir a transformação maligna da célula (Figura 5).

Assim, os resultados apresentados na primeira etapa desta tese oferecem evidências importantes para o fortalecimento da relação entre inflamação e envelhecimento, além de demonstrarem pela primeira vez a capacidade de CCL11 de induzir senescência celular em fibroblastos saudáveis.

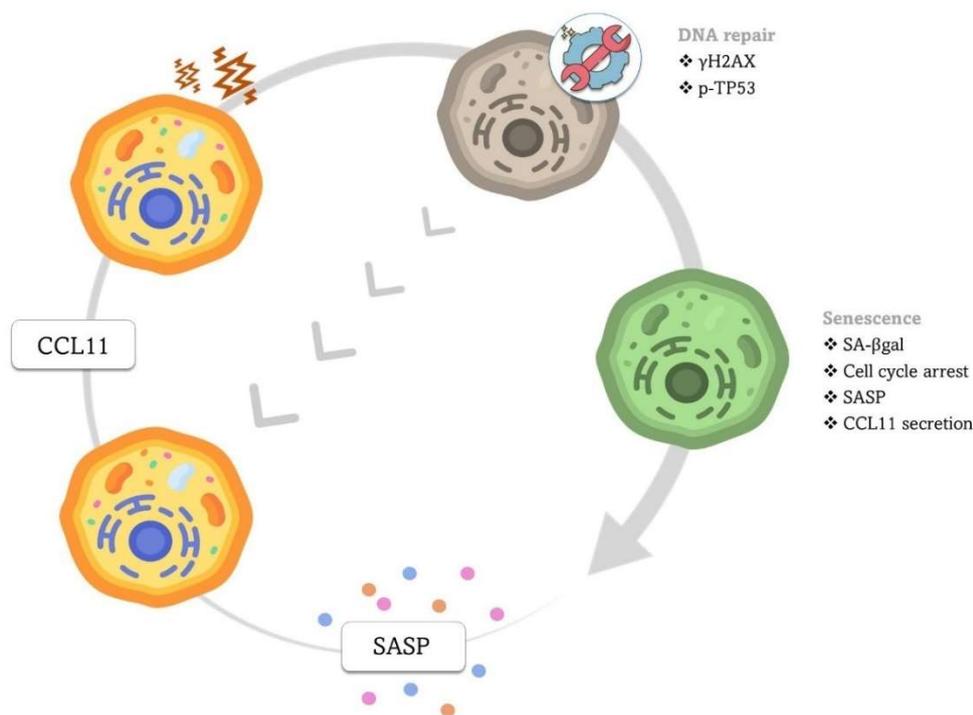


Figura 5 | Mecanismos possivelmente desencadeados durante o processo de indução de senescência celular por CCL11. γ H2AX: histona variante da família de proteínas H2A fosforilada. p-TP53: proteína tumoral 53 fosforilada. SA- β -gal: enzima β -galactosidase associada a senescência. SASP: fenótipo secretor associado a senescência. CCL11: quimiocina 11 de motivo C-C.

Em sequência, a partir da observação de que os níveis de CCL11 estão elevados na asma, juntamente com a crescente compreensão do papel dessa molécula como um agente indutor de envelhecimento celular, passamos a nos perguntar se esse fenômeno se refletiria também a nível sistêmico. Especificamente, questionamos se a asma seria capaz de desencadear alterações na função cognitiva basal compatíveis com um processo de envelhecimento precoce.

Nesse contexto, Villeda e colaboradores (2012) foram pioneiros na compreensão do impacto da expressão plasmática de CCL11 sobre o sistema nervoso central (SNC). Inicialmente, os autores descreveram o aumento da concentração plasmática de CCL11 em humanos e em modelo murino, correlacionando-a com o envelhecimento cronológico. Com o objetivo de melhor compreender o impacto dessa quimiocina sobre a homeostase encefálica, os pesquisadores expuseram camundongos saudáveis à CCL11 recombinante. Como resultado,

observaram que eotaxina-1/CCL11 é capaz de induzir tanto alterações celulares, manifestadas pelo comprometimento da neurogênese com redução na expressão da proteína doublecortina, quanto alterações comportamentais, expressas pelo declínio das funções cognitivas associadas ao aprendizado e à memória (Villeda et al., 2011). Esses resultados não apenas destacam o papel central da CCL11 no processo de envelhecimento, mas também elucidam o impacto que a expressão de citocinas plasmáticas pode exercer sobre a funcionalidade do SNC.

No contexto da asma, estudos recentes têm explorado o papel dessa condição pró-inflamatória crônica no desempenho cognitivo. Uma revisão sistemática com meta-análise baseada em estudos avaliando diferentes aspectos da cognição em pacientes com asma revelou comprometimento significativo no desempenho acadêmico, funcionamento executivo, velocidade de processamento, aprendizado e memória em indivíduos asmáticos (Irani et al., 2017).

Ademais, é reconhecido que a inflamação crônica pode desencadear alterações estruturais e fisiológicas que contribuem para uma maior susceptibilidade a transtornos neuropsiquiátricos (Bauer & Teixeira, 2019). Corroborando essa perspectiva, Ye e colaboradores (2021) conduziram uma meta-análise com base em estudos quantitativos sobre a prevalência de sintomas associados à ansiedade e transtornos de ansiedade na população asmática. Como resultado, os autores descrevem um risco 1,8 vezes maior para o desenvolvimento de sintomas de ansiedade e 2,1 maior para o desenvolvimento de transtornos de ansiedade em indivíduos asmáticos com comparação com controles não asmáticos. Esse achado fortalece a percepção de que a ansiedade representa um desfecho importante no contexto da asma (Ye et al., 2021).

No entanto, avaliação de alterações cognitivas em estudos de associação apresenta limitações, uma vez que essa abordagem envolve a presença de numerosas variáveis confundidoras, tais como hospitalizações, estressores ambientais e condições socioeconômicas. A presença desses fatores de confusão, inerente aos estudos de coorte em humanos, dificulta o

estabelecimento de uma relação causal direta entre o comprometimento cognitivo e a condição patológica subjacente. Portanto, os modelos animais surgem como ferramentas valiosas na investigação das relações de causalidade entre a fisiopatologia da asma e o comprometimento da função cognitiva.

A partir dessa perspectiva, no segundo capítulo desta tese, examinamos diferentes aspectos cognitivos e comportamentais de camundongos C57BL/6J machos submetidos a um protocolo de indução de asma por exposição ao extrato de ácaros domésticos *D. pteronyssinus*. Durante o teste de interação social, a diminuição na atividade locomotora e na proximidade social são interpretadas como uma redução na motivação e investigação sociais inatas em roedores, sendo compreendidos como características associadas a ansiedade (Shoji et al., 2016). Nesse sentido, nossos resultados demonstraram uma intensificação dos comportamentos associados à ansiedade em camundongos asmáticos em comparação ao grupo controle, evidenciada pela maior latência para entrada na zona de interação, maior tempo de imobilidade e menor distância percorrida em resposta à exposição a um camundongo não familiar. Esses achados representam a primeira evidência de alterações comportamentais associadas à ansiedade em resposta à novidade social em um modelo murino de asma.

Esse achado encontra respaldo em um estudo recente, que avalia parâmetros associados a ansiedade em camundongos fêmea da linhagem BALB/cJ submetidas a protocolo de indução de asma por ovalbumina (OVA). Os resultados demonstram que camundongos asmáticos manifestam um aumento no tempo de permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevada em relação ao grupo controle, indicando aumento do comportamento ansioso (Antunes et al., 2022). Portanto, conjuntamente, esses resultados sugerem que a ansiedade pode representar uma resposta cognitiva de base biológica importante no contexto da asma.

Conforme mencionado anteriormente, uma das características mais notáveis do envelhecimento é a instauração de um perfil pró-inflamatório crônico e sistêmico, o qual se

correlaciona com o declínio funcional de diversos órgãos e tecidos. Em consonância com a perspectiva de compreensão da asma enquanto uma condição associada ao envelhecimento precoce, nossos resultados evidenciaram um aumento significativo na expressão das citocinas IL-4, INF γ e IL-17A no plasma de camundongos asmáticos, destacando a perpetuação de um estado pró-inflamatório sistêmico também nessa condição.

Embora o declínio cognitivo apresente-se de forma heterogênea, como consequência de estressores variados, evidências crescentes sugerem que a persistência de um fenótipo inflamatório desempenhe um papel importante no comprometimento da homeostase do SNC. Nesse cenário, Monteiro *et al.* (2016) demonstraram que camundongos com nocaute de INF γ apresentam recuperação da neurogênese, associada com um melhor desempenho em testes cognitivos de aprendizagem e memória (Monteiro et al., 2016). Ainda, resultados adicionais sugerem que a depleção de INF γ está diretamente ligada à redução de comportamentos ansiosos em diferentes testes, como condicionamento do medo contextual, ensaio de campo aberto e labirinto em cruz elevada (Campos et al., 2014).

Em concordância com essa perspectiva, um estudo recente revelou uma associação entre a expressão elevada de IL-17 e comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão em camundongos expostos a estresse perinatal cumulativo. O estudo mostrou uma expressão aumentada de IL-17 em regiões encefálicas centrais, incluindo o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal. Interessantemente, a inibição de IL-17 mostrou-se capaz de aliviar esses sintomas, evidenciado pela redução no tempo gasto nos braços fechados durante o teste de labirinto em cruz elevado (Kim et al., 2021). O córtex pré-frontal medial e a amígdala desempenham um papel crucial na regulação dos comportamentos sociais (Tanimizu et al., 2017), sugerindo o impacto funcional dessa citocina sobre o desenvolvimento de manifestações comportamentais associados a ansiedade social na asma.

Ainda, em um estudo conduzido por Lewkowich et al. (2020), utilizando um modelo murino de asma induzida por ácaro de poeira doméstica (*house dust mite* – HDM), foi evidenciado o desenvolvimento de um perfil inflamatório periférico característico da asma grave. Interessantemente, esta resposta inflamatória, marcada por uma combinação de padrões Th2/Th17, assemelha-se àquela observada em nosso estudo. Explorando a interposição entre inflamação sistêmica e o comprometimento da homeostase encefálica, os pesquisadores examinaram a expressão de citocinas associadas às respostas Th2 e Th17 no tecido nervoso desses animais, notando um aumento significativo de IL-17, porém não de IL-13, em camundongos asmáticos. Notavelmente, demonstraram ainda que os camundongos expostos a HDM, além do aumento na expressão encefálica de IL-17, também exibiam comportamentos relacionados a ansiedade durante a fase de extinção da imobilidade, quando submetidos a reexposição contextual no ensaio de condicionamento contextual de medo (Lewkowich et al., 2020), reiterando a associação entre essa citocina e o comportamento ansioso.

Por fim, um outro estudo demonstrou que camundongos submetidos ao protocolo de indução de asma por OVA, não apenas exibiram exacerbação de comportamentos associados a ansiedade, como também apresentaram aumentos significativos nos níveis encefálicos das citocinas pró-inflamatórias IL-9, IL-13, eotaxina-1/CCL11 e IL-1 β (Antunes et al., 2022). Ao considerarmos esses resultados coletivamente, torna-se possível inferir que a fisiopatologia da asma transcende o sistema respiratório, perpetuando-se por meio de um estado inflamatório crônico e disseminado que parece influenciar negativamente a homeostase do SNC.

Objetivando ampliar a compreensão acerca dos impactos sistêmicos da asma, realizamos o monitoramento do peso corporal dos camundongos submetidos ao protocolo de asma induzida por HDM ao longo do tempo. Nossos resultados indicaram uma diminuição progressiva no peso corporal dos camundongos asmáticos em comparação com o grupo controle, a partir da quarta semana após o início do protocolo. Isso sugere que a fisiopatologia da asma pode se manifestar

não apenas por meio de sintomas respiratórios e alterações comportamentais, mas também pela promoção de uma redução global no peso corporal.

Embora esse achado pareça contraditório ao senso comum, que frequentemente associa a asma ao aumento de peso e à obesidade, ele está em consonância com a literatura. A exemplo, um estudo avaliando asma induzida por OVA em camundongos machos C57BL/6 J revela uma diminuição no ganho de peso corporal em comparação ao grupo controle quando expostos a uma dieta rica em gordura. Além disso, observou-se que essa redução está associada ao aumento no gasto energético nesses animais, decorrente da elevação da taxa metabólica basal (Song et al., 2019). Adicionalmente, evidências sugerem que a diminuição do peso corporal em modelos murinos é atenuada pela administração de dexametasona, sugerindo que o processo inflamatório gerado pela resposta alérgica contribua para a perda de peso em indivíduos asmáticos (Ren et al., 2021).

Em suma, esses dados sugerem que a exposição prolongada a HDM promove a diferenciação de linfócitos Th1, Th2 e Th17, culminando na liberação das citocinas pró-inflamatórias $INF\gamma$, IL-4 e IL-17, respectivamente, na corrente sanguínea. Possivelmente, a expressão crônica e sistêmica dessas citocinas resulte no estabelecimento de uma resposta inflamatória também a nível de SNC, resultando na manifestação comportamental de sintomas associados a ansiedade (Figura 6).

Portanto, o capítulo 2 desta tese apresenta evidências significativas que contribuem para uma compreensão mais ampla acerca dos impactos sistêmicos da asma. Contrariando a percepção convencional da asma como uma condição restrita ao sistema respiratório, nossos resultados revelam que sua fisiopatologia envolve não apenas manifestações respiratórias, mas também um perfil pró-inflamatório sistêmico persistente, a redução no peso corporal global e a exacerbação de comportamentos associado à ansiedade. Essas descobertas destacam a

complexidade e a extensão dos efeitos da asma no organismo, representando um avanço significativo para uma compreensão mais aprofundada dessa condição.

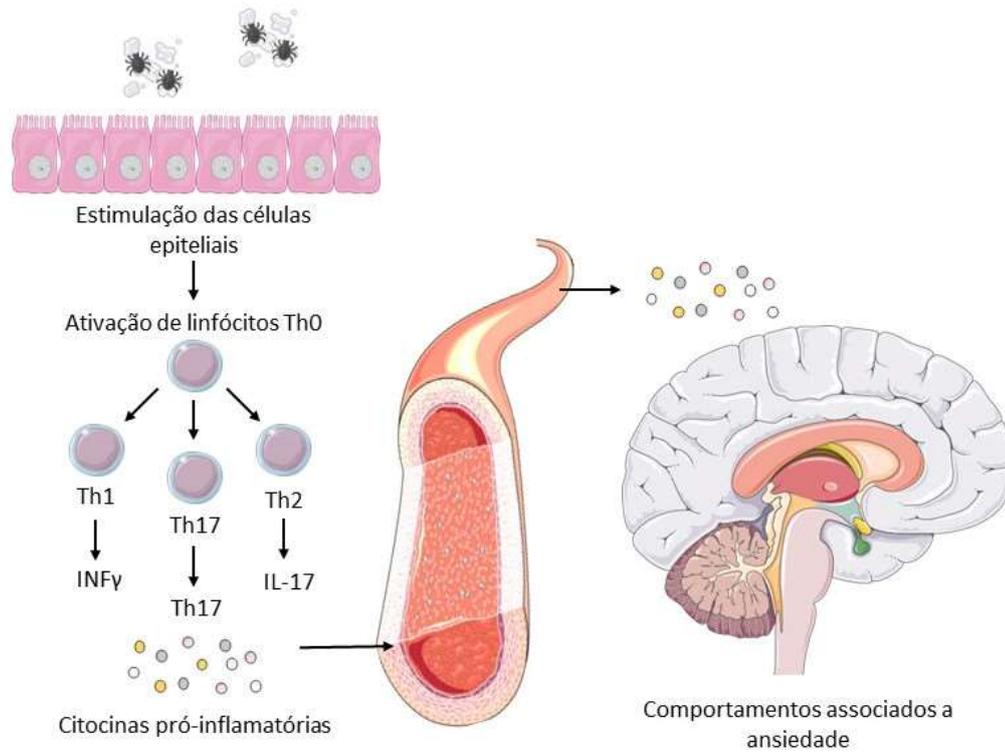


Figura 6 | Mecanismos propostos para o desenvolvimento de comportamentos associados a ansiedade em camundongos asmáticos expostos a HDM. Th: linfócitos T auxiliares. IL-17: interleucina 17. INF γ : interferon γ .

III.2. CONCLUSÃO

A asma é tradicionalmente reconhecida como uma condição marcada pela hiperresponsividade brônquica acompanhada por inflamação e obstrução das vias aéreas. No entanto, as implicações da asma para além do acometimento respiratório ainda são pouco compreendidas. Portanto, o presente estudo representa um esforço no sentido de ampliar a percepção da fisiopatologia da asma, com foco principalmente no papel dessa condição na promoção de alterações associadas ao envelhecimento precoce.

Nesse sentido, demonstramos pela primeira vez o papel da eotaxina-1/CCL11, uma quimiocina importante para o estabelecimento da eosinofilia na asma, na indução de senescência celular em fibroblastos pulmonares humanos por meio da indução de estresse oxidativo e dano ao DNA. Além disso, este estudo contribui para uma compreensão mais abrangente dos efeitos da asma para além do comprometimento das vias aéreas, sugerindo o estabelecimento de um perfil pró-inflamatório crônico e sistêmico, associado à redução do peso corporal e ao aumento de comportamentos associados à ansiedade em camundongos submetidos ao protocolo de indução de asma.

III.3. PERSPECTIVAS

Papel do CCL11 sobre a homeostase do parênquima pulmonar

1. Investigar se fibroblastos senescentes expostos a CCL11 apresentam características associadas ao remodelamento tecidual característico da asma.
2. Avaliar se o meio condicionado de células senescentes induzidas por CCL11 é capaz de promover a proliferação e ativação de células epiteliais alveolares de adenocarcinoma da linhagem A549.

Impactos da asma sobre a funcionalidade do SNC

1. Investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento de comportamentos associados a ansiedade em camundongos submetidos a protocolo de asma crônica induzida por HDM por meio da avaliação presença de marcadores inflamatórios (citocinas pró-inflamatórias e microgliose via expressão Iba-1), bem como de marcadores de senescência celular, como a elevação de γ H2AX e TP53, e a redução de Doublecortin (Dcx) no SNC.
3. Avaliar a presença de CCL11 no BAL, plasma e parênquima encefálico de camundongos asmáticos.
4. Avaliar a presença de IL-17 no parênquima encefálico de camundongos asmáticos.
5. Investigar se IL-17 promove o aumento de marcadores associados à ativação e senescência em células da linhagem microglial murina BV-2.

REFERÊNCIAS

- A Singer, M. (2016). The Origins of Aging: Evidence that Aging is an Adaptive Phenotype. *Current Aging Science*, 9(2), 95–115. <https://doi.org/10.2174/1874609809666160211124947>
- Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi-Kangevari, M., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abegaz, K. H., Abolhassani, H., Aboyans, V., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., Abualhasan, A., Abu-Raddad, L. J., Abushouk, A. I., Adabi, M., Adekanmbi, V., Adeoye, A. M., Adetokunboh, O. O., ... Amini, S. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Aghali, A., Khalfaoui, L., Lagnado, A. B., Drake, L. Y., Teske, J. J., Pabelick, C. M., Passos, J. F., & Prakash, Y. S. (2022). Senescence in the Lung: Cellular senescence is increased in airway smooth muscle cells of elderly persons with asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 323(5), L558. <https://doi.org/10.1152/AJPLUNG.00146.2022>
- Al-Ramli, W., Préfontaine, D., Chouiali, F., Martin, J. G., Olivenstein, R., Lemièrre, C., & Hamid, Q. (2009). T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 123(5), 1185–1187. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2009.02.024>
- Antunes, G. L., Silveira, J. S., Luft, C., Greggio, S., Venturin, G. T., Schmitz, F., Biasibetti-Brendler, H., Vuolo, F., Dal-Pizzol, F., da Costa, J. C., Wyse, A. T. S., Pitrez, P. M., & da Cunha, A. A. (2022). Airway inflammation induces anxiety-like behavior through neuroinflammatory, neurochemical, and neurometabolic changes in an allergic asthma

- model. *Metabolic Brain Disease*, 37(4), 911–926. <https://doi.org/10.1007/S11011-022-00907-8>
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonina, T., Lebrasseur, N. K., Childs, B. G., Van De Sluis, B., Kirkland, J. L., & Van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479(7372), 232–236. <https://doi.org/10.1038/NATURE10600>
- Barbé-Tuana, F. M., Grun, L. K., Pierdoná, V., Parisi, M. M., Friedrich, F., Guma, F. T. C. R., Pinto, L. A., Stein, R. T., Pitrez, P. M. C., & Jones, M. H. (2021). Shorter telomeres in children with severe asthma, an indicative of accelerated aging. *Aging (Albany NY)*, 13(2), 1686. <https://doi.org/10.18632/AGING.202527>
- Bauer, M. E., & Teixeira, A. L. (2019). Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1437(1), 57–67. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13712>
- Blackburn, E. H., Epel, E. S., & Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science*, 350(6265). <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>
- Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J. Y., Barnéon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafontaine, J., Godard, P., & Michel, F.-B. (1990). Eosinophilic Inflammation in Asthma. *New England Journal of Medicine*, 323(15), 1033–1039. <https://doi.org/10.1056/nejm199010113231505>
- Brandenberger, C., & Mühlfeld, C. (2017). Mechanisms of lung aging. *Cell and Tissue Research*, 367(3), 469–480. <https://doi.org/10.1007/S00441-016-2511-X>
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 685. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-030212-183653>

- Campisi, J., Andersen, J. K., Kapahi, P., & Melov, S. (2011). Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Seminars in Cancer Biology*, *21*(6), 354. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2011.09.001>
- Campos, A. C., Vaz, G. N., Saito, V. M., & Teixeira, A. L. (2014). Further evidence for the role of interferon-gamma on anxiety- and depressive-like behaviors: involvement of hippocampal neurogenesis and NGF production. *Neuroscience Letters*, *578*, 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2014.06.039>
- Cançado, J. E. D., Penha, M., Gupta, S., Li, V. W., Julian, G. S., & Moreira, E. de S. (2019). Respira project: Humanistic and economic burden of asthma in Brazil. *The Journal of Asthma : Official Journal of the Association for the Care of Asthma*, *56*(3), 244–251. <https://doi.org/10.1080/02770903.2018.1445267>
- Correia-Melo, C., Hewitt, G., & Passos, J. F. (2014). Telomeres, oxidative stress and inflammatory factors: partners in cellular senescence? *Longevity & Healthspan*, *3*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2046-2395-3-1>
- D'Adda Di Fagagna, F. (2008a). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer* *2008* *8*:7, *8*(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- D'Adda Di Fagagna, F. (2008b). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer* *2008* *8*:7, *8*(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- Daldegan, M. B., Teixeira, M. M., & Talvani, A. (2005). Concentration of CCL11, CXCL8 and TNF- α in sputum and plasma of patients undergoing asthma or chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *38*(9), 1359–1365. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000900010>

- de Araujo Cardoso, T., Roncada, C., Rodrigues da Silva, E., Araujo Pinto, L., Herbert Jones, M., Tetelbon Stein, R., & Márcio Pitrez, P. (2017). *The impact of asthma in Brazil: a longitudinal analysis of data from a Brazilian national database system*. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000352>
- Fahy, J. V. (2009). Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma: insights from clinical studies. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(3), 256–259. <https://doi.org/10.1513/PATS.200808-087RM>
- Fahy, J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Reviews. Immunology*, 15(1), 57. <https://doi.org/10.1038/NRI3786>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 908(1), 244–254. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2000.TB06651.X>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014a). Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
- Franceschi, C., & Campisi, J. (2014b). Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 69(Suppl 1), S4–S9. <https://doi.org/10.1093/gerona/glu057>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., Monti, D., Capri, M., & Salvioli, S. (2018). The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates. *Frontiers in Medicine*, 5(MAR), 1. <https://doi.org/10.3389/FMED.2018.00061>

- Frasca, D., Blomberg, B. B., & Paganelli, R. (2017). Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC), 1745. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01745>
- Free, P. B. (n.d.). *PUBLICAÇÃO OFICIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma-2012*. Retrieved January 13, 2024, from www.jornaldepneumologia.com.br
- GLOBAL STRATEGY FOR ASTHMA MANAGEMENT AND PREVENTION*. (n.d.). Retrieved January 17, 2024, from www.ginasthma.org.
- Hadj Salem, I., Dubé, J., Boulet, L. P., & Chakir, J. (2015). Telomere shortening correlates with accelerated replicative senescence of bronchial fibroblasts in asthma. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 45(11), 1713–1715. <https://doi.org/10.1111/CEA.12611>
- Henckel, E., Svenson, U., Nordlund, B., Berggren Broström, E., Hedlin, G., Degerman, S., & Bohlin, K. (2018). Telomere length was similar in school-age children with bronchopulmonary dysplasia and allergic asthma. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 107(8), 1395–1401. <https://doi.org/10.1111/APA.14294>
- Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2018.02.001>
- Holgate, S. T., Wenzel, S., Postma, D. S., Weiss, S. T., Renz, H., & Sly, P. D. (2015). Asthma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15025. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.25>
- Hough, K. P., Curtiss, M. L., Blain, T. J., Liu, R. M., Trevor, J., Deshane, J. S., & Thannickal, V. J. (2020). Airway Remodeling in Asthma. *Frontiers in Medicine*, 7, 191. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00191>

- Huang, A. X., Lu, L. W., Liu, W. J., & Huang, M. (2016). Plasma Inflammatory Cytokine IL-4, IL-8, IL-10, and TNF- α Levels Correlate with Pulmonary Function in Patients with Asthma-Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) Overlap Syndrome. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2800. <https://doi.org/10.12659/MSM.896458>
- Huax, F., Gharaee-Kermani, M., Liu, T., Morel, V., McGarry, B., Ullenbruch, M., Kunkel, S. L., Wang, J., Xing, Z., & Phan, S. H. (2005). Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC Chemokine Receptor 3 (CCR3) in Bleomycin-Induced Lung Injury and Fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 167(6), 1485–1496. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61235-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61235-7)
- Irani, F., Barbone, J. M., Beausoleil, J., & Gerald, L. (2017). Is asthma associated with cognitive impairments? A meta-analytic review. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 39(10), 965–978. <https://doi.org/10.1080/13803395.2017.1288802>
- Khalfaoui, L., Symon, F. A., Couillard, S., Hargadon, B., Chaudhuri, R., Bicknell, S., Mansur, A. H., Shrimanker, R., Hinks, T. S. C., Pavord, I. D., Fowler, S. J., Brown, V., McGarvey, L. P., Heaney, L. G., Austin, C. D., Howarth, P. H., Arron, J. R., Choy, D. F., & Bradding, P. (2022). Airway remodelling rather than cellular infiltration characterizes both type2 cytokine biomarker-high and -low severe asthma. *Allergy*, 77(10), 2974. <https://doi.org/10.1111/ALL.15376>
- Kim, J., Suh, Y. H., & Chang, K. A. (2021). Interleukin-17 induced by cumulative mild stress promoted depression-like behaviors in young adult mice. *Molecular Brain*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S13041-020-00726-X/TABLES/2>

- Konno, S. I., Gonokami, Y., Kurokawa, M., Kawazu, K., Asano, K., Okamoto, K. I., & Adachi, M. (1996). Cytokine concentrations in sputum of asthmatic patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, *109*(1), 73–78. <https://doi.org/10.1159/000237234>
- Kuruvilla, M. E., Lee, F. E. H., & Lee, G. B. (2019). Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *56*(2), 219. <https://doi.org/10.1007/S12016-018-8712-1>
- Kyoh, S., Venkatesan, N., Poon, A. H., Nishioka, M., Lin, T. Y., Baglole, C. J., Eidelman, D. H., & Hamid, Q. (2013). Are leukocytes in asthmatic patients aging faster? A study of telomere length and disease severity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *132*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.02.010>
- Labarthe, D. R., Goldstein, L. B., Antman, E. M., Arnett, D. K., Fonarow, G. C., Alberts, M. J., Hayman, L. L., Khera, A., Sallis, J. F., Daniels, S. R., Sacco, R. L., Li, S., Ku, L., Lantz, P. M., Robinson, J. G., Creager, M. A., Van Horn, L., Kris-Etherton, P., Bhatnagar, A., & Whitsel, L. P. (2016). Evidence-Based Policy Making: Assessment of the American Heart Association's Strategic Policy Portfolio. *Circulation*, *133*(18). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000410>
- Lee, Y. C., Lee, K. H., Lee, H. B., & Rhee, Y. K. (2001). Serum Levels of Interleukins (IL)-4, IL-5, IL-13, and Interferon- γ in Acute Asthma. *Journal of Asthma*, *38*(8), 665–671. <https://doi.org/10.1081/JAS-100107544>
- Lewkowich, I., Ahlbrand, R., Johnson, E., McAlees, J., Nawreen, N., Raman, R., Lingel, I., Hargis, J., Hoover, C., & Sah, R. (2020). Modulation of fear behavior and neuroimmune alterations in house dust mite exposed A/J mice, a model of severe asthma. *Brain, Behavior, and Immunity*, *88*, 688–698. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2020.04.084>

- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. In *Cell* (Vol. 186, Issue 2, pp. 243–278). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>
- Louis, R., Lau, L. C. K., Bron, A. O., Roldaan, A. C., Radermecker, M., & Djukanović, R. (2000). The relationship between airways inflammation and asthma severity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *161*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1164/AJRCCM.161.1.9802048>
- Marchioro, J., Gazzotti, M. R., Nascimento, O. A., Montealegre, F., Fish, J., & Jardim, J. R. (2014). Level of asthma control and its relationship with medication use in asthma patients in Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, *40*(5), 487–494. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132014000500004>
- Mishra, A., Hogan, S. P., Brandt, E. B., & Rothenberg, M. E. (2001). An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *Journal of Clinical Investigation*, *107*(1), 83. <https://doi.org/10.1172/JCI10224>
- Monteiro, S., Ferreira, F. M., Pinto, V., Roque, S., Morais, M., De Sá-Calçada, D., Mota, C., Correia-Neves, M., & Cerqueira, J. J. (2016). Absence of IFN γ promotes hippocampal plasticity and enhances cognitive performance. *Translational Psychiatry*, *6*(1), e707. <https://doi.org/10.1038/TP.2015.194>
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: From physiology to pathology. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 15, Issue 7, pp. 482–496). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>

- Olivieri, F., Prattichizzo, F., Grillari, J., & Balistreri, C. R. (2018). Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9076485>
- Ordoñez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A., & Fahy, J. V. (2000). Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161(4 Pt 1), 1185–1190. <https://doi.org/10.1164/AJRCCM.161.4.9812061>
- Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S. E., & Reddel, H. K. (2018). Asthma. *Lancet (London, England)*, 391(10122), 783–800. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33311-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33311-1)
- Peri, F., Amaddeo, A., Badina, L., Maschio, M., Barbi, E., & Ghirardo, S. (2023). T2-Low Asthma: A Discussed but Still Orphan Disease. *Biomedicines*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11041226>
- Pitrez, P. M., Giavina-Bianchi, P., Rizzo, J. Â., Souza-Machado, A., Garcia, G. F., & Pizzichini, M. M. M. (2021). An expert review on breaking barriers in severe asthma in Brazil: Time to act. *Chronic Respiratory Disease*, 18. <https://doi.org/10.1177/14799731211028259>
- Pizzichini, M. M. M. (2002). Is sputum eosinophilia a good or poor predictor of benefit from inhaled corticosteroid therapy in asthma? *European Respiratory Journal*, 20(6), 1359–1361. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00068102>
- Porsbjerg, C., Melén, E., Lehtimäki, L., & Shaw, D. (2023). Asthma. *The Lancet*, 401(10379), 858–873. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02125-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02125-0)
- Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T. B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., Wenzel, S., Ray, P., & Ray, A. (2015). High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3037. <https://doi.org/10.1172/JCI80911>

- Renaudin, X. (2021). Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 364, 139–161. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2021.04.001>
- Roncada, C., de Oliveira, S. G., Cidade, S. F., Sarria, E. E., Mattiello, R., Ojeda, B. S., dos Santos, B. R. L., Gustavo, A. da S., Pinto, L. A., Jones, M. H., Stein, R. T., & Pitrez, P. M. (2016). Burden of asthma among inner-city children from Southern Brazil. *The Journal of Asthma : Official Journal of the Association for the Care of Asthma*, 53(5), 498–504. <https://doi.org/10.3109/02770903.2015.1108438>
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 7, pp. 397–408). <https://doi.org/10.1038/nrc3960>
- Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., & Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain* 2016 9:1, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/S13041-016-0191-9>
- Tanimizu, T., Kenney, J. W., Okano, E., Kadoma, K., Frankland, P. W., & Kida, S. (2017). Functional Connectivity of Multiple Brain Regions Required for the Consolidation of Social Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, 37(15), 4103. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3451-16.2017>
- Tilstra, J. S., Robinson, A. R., Wang, J., Gregg, S. Q., Clauson, C. L., Reay, D. P., Nasto, L. A., St Croix, C. M., Usas, A., Vo, N., Huard, J., Clemens, P. R., Stolz, D. B., Guttridge, D. C., Watkins, S. C., Garinis, G. A., Wang, Y., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2012). NF- κ B inhibition delays DNA damage–induced senescence and aging in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2601. <https://doi.org/10.1172/JCI45785>
- Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J. S., Couillard-Després, S., Aigner,

- L., Li, G., Peskind, E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., ... Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90–96. <https://doi.org/10.1038/nature10357>
- Vizmanos-Lamotte, G., Moreno-Galdō, A., Muñoz, X., Gómez-Ollés, S., Gartner, S., & Cruz, M. J. (2013). Induced sputum cell count and cytokine profile in atopic and non-atopic children with asthma. *Pediatric Pulmonology*, 48(11), 1062–1069. <https://doi.org/10.1002/PPUL.22769>
- Wan, R., Srikaram, P., Guntupalli, V., Hu, C., Chen, Q., & Gao, P. (2023). Cellular senescence in asthma: from pathogenesis to therapeutic challenges. *EBioMedicine*, 94. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104717>
- Wang, Z. N., Su, R. N., Yang, B. Y., Yang, K. X., Yang, L. F., Yan, Y., & Chen, Z. G. (2020). Potential Role of Cellular Senescence in Asthma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 59. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2020.00059>
- Wei, Q., Liao, J., Jiang, M., Liu, J., Liang, X., & Nong, G. (2021). Relationship between Th17-mediated immunity and airway inflammation in childhood neutrophilic asthma. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13223-020-00504-3/FIGURES/5>
- Wu, J., Dong, F., Wang, R. A., Wang, J., Zhao, J., Yang, M., Gong, W., Cui, R., & Dong, L. (2013). Central role of cellular senescence in TSLP-induced airway remodeling in asthma. *PloS One*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077795>
- Yang, L., Xing, S., Wang, K., Yi, H., & Du, B. (2018). Paeonol attenuates aging MRC-5 cells and inhibits epithelial-mesenchymal transition of premalignant HaCaT cells induced by aging MRC-5 cell-conditioned medium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 439(1–2), 117–129. <https://doi.org/10.1007/S11010-017-3141-7>

Ye, G., Baldwin, D. S., & Hou, R. (2021). Anxiety in asthma: a systematic review and meta-analysis. *Psychological Medicine*, 51(1), 11–20. <https://doi.org/10.1017/S0033291720005097>

Ying, S., Robinson, D. S., Meng, Q., Rottman, J., Kennedy, R., Ringler, D. J., Mackay, C. R., Daugherty, B. L., Springer, M. S., Durham, S. R., Williams, T. J., & Kay, A. B. (1997). Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells. *European Journal of Immunology*, 27(12), 3507–3516. <https://doi.org/10.1002/EJI.1830271252>

ANEXOS

ANEXO I – Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da PUCRS



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9529

Porto Alegre, 21 de janeiro de 2020

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação do impacto de doenças pulmonares crônicas na função cognitiva e envelhecimento celular no sistema nervoso central" coordenado por FLORENCIA MARIA BARBE T U A N A .

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 21/01/2020 - 21/03/2023

Nº de Animais	Espécie
143	Mus musculus
Total de Animais: 143	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)